Studien zur Fermentation neuer Nikkomycine mit freien und immobilisierten Zellen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Franz Walz

aus Ittenhausen

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543922_0028

STUDIEN ZUR FERMENTATION NEUER NIKKOMYCINE MIT FREIEN UND IMMOBILISIERTEN ZELLEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
FRANZ WALZ
aus Ittenhausen

1986

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1985

Dekan:	Professor Dr. R. Hampp
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Wolf

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die großzügige Förderung danke ich Herrn Prof. Dr. H. Zähner herzlich.

Herrn Dr. H.-P. Fiedler danke ich ganz besonders für die Bereitstellung der HPLC-Analytik und der Photo-Dioden-Array-Technik. Frl. A. Döhle danke ich herzlich für deren sorgfältige Durchführung.

Bei Frau Dr. C. Bormann möchte ich mich sehr für die vielen anregenden Diskussionen und die hervorragende Zusammenarbeit bedanken. Den weiteren Mitarbeitern der Nikkomycin-Arbeitsgruppe, Dipl. Biol. C. Conzelmann, Dr. J. Delzer und Dr. R. Kurth danke ich für ihre stetige Diskussionsbereitschaft.

Mit Herrn Dr. P. Reuschenbach haben mich nicht nur die gemeinsame Leitung der Fermentation, sondern auch unzählige interessante Gespräche über das Fachgebiet hinaus verbunden. Dafür danke ich ihm ganz herzlich.

Bei Herrn G. Grewe möchte ich mich besonders für seine engagierte und gewissenhafte Mitarbeit bei der Organisation der Fermentation bedanken.

Herrn K. Wusch danke ich für das Zeichnen der Abbildungen.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

			Seite
I.	EINLEITUNG		1
II.	**MATERIAL UND METHODEN**		9
	1.	Chemikalien	9
	2.	Nährmedien	10
	2.1.	Medien für Stammhaltung und Testplatten	10
	2.2.	Produktionsmedien	11
	3.	Mikroorganismen	12
	3.1.	Nikkomycinproduzenten	12
	3.2.	Testorganismen	12
	4.	Kulturbedingungen Tü 901	13
	4.1.	Stammhaltung und -aufbewahrung	13
	4.2.	Sporengewinnung	14
	4.3.	Schüttelkulturen	14
	4.4.	'resting-cell' Kulturen	14
	4.4.1.	Herstellung der Zellsuspension	14
	4.4.2.	'resting-cell' Schüttelkulturen	15
	4.4.3.	'resting-cell' Kulturen im Blattrührfermenter	15
	4.5.	Immobilisierung durch Einschluß in Calciumalginat-Gel	15
	4.5.1.	Immobilisierung von Zellen	15
	4.5.2.	Immobilisierung von Sporen	16
	4.5.3.	Semikontinuierliche Fermentation mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen	18

4.5.4.	Sporenimmobilisierung im Blattrührfermenter (Biostat S/V)	18
4.5.5.	Bestimmung der Gelkugelgröße	19
4.5.6.	Auflösen des Calciumalginat-Gels	19
4.6.	Fermentation	19
4.6.1.	Fermenterbeschreibung	19
4.6.1.1.	Biostat E (10 l Blattrührfermenter)	19
4.6.1.2.	Biostat S/V (6 l Blattrührfermenter)	20
4.6.2.	Fermentationsbedingungen	21
4.6.2.1.	Biostat E	21
4.6.2.2.	Biostat S/V	21
5.	Fermentationsanalysen	22
5.1.	Myzeltrockengewicht	22
5.2.	Nikkomycinbestimmung	22
5.2.1.	Plattendiffusionstest	22
5.2.2.	Analytische HPLC	22
5.3.	Stärkebestimmung	23
5.4.	Glucosebestimmung	23
5.5.	Mannitbestimmung	23
5.6.	Phosphatbestimmung	23
5.7.	Stickstoffbestimmung	24
6.	Fettsäurenanalyse	24
7.	Mutagenese und Gewinnung von Resistenzmutanten	24
8.	Isolierung und Charakterisierung von Nikkomycin W	25
8.1.	Aufarbeitung von Nikkomycin W	25
8.2.	Barbitursäure-Reaktion	25
8.3.	UV-Spektren	25
8.4.	Stabilitätstest	25
8.5.	Vergleichendes Wirkungsspektrum	26

III. **ERGEBNISSE**

1.	Stammbeschreibung	27
2.	Suche nach Überproduzenten	27
3.	Fermentationsoptimierung	28
3.1.	Optimierung des komplexen Produktionsmediums	28
		28
3.1.1.	Kohlenstoffquelle	28
3.1.2.	Stickstoffquelle	29
3.2.	batch-Fermentation	32
4.	Optimierung des 'resting-cell' Systems	35
4.1.	Alter der Vorkultur	36
4.2.	Zelldichte	37
4.3.	pH-Wert	39
5.	Untersuchungen im definierten Medium	39
5.1.	Kohlenstoffquelle	40
5.2.	Stickstoffquelle	41
5.3.	Spurenelemente	43
5.4.	Einfluß von anorganischem Phosphat	46
5.5.	Zusatz von Isoleucin	46
5.5.1	Einfluß von Isoleucin auf das Fettsäurenmuster der Cytoplasmamembran	47
5.6.	Tyrosinverfütterung	49
5.7.	Uracilverfütterung	50
6.	Nikkomycinproduktion mit immobilisierten Zellen	51
6.1.	Vergleich der Nikkomycinproduktion mit freien und immobilisierten Zellen	52
6.2.	Variation der Gelkugelgröße	54

7.	Immobilisierung von Sporen	55
7.1.	Wachstum im Gel	56
7.2.	Optimierung der Sporenimmobilisierung	58
7.2.1.	Inkubationsdauer	59
7.2.2.	Sporentiter	60
7.2.3.	Alginatkonzentration	61
7.2.4.	Größe der Gelperlen	62
7.2.5.	Wachstumsbedingungen	63
7.3.	Nikkomycinproduktion mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen im definierten Medium	64
7.3.1.	Gelmenge	65
7.3.2.	Belüftung	65
7.3.3.	batch-Fermentation mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen im Blattrührfermenter	67
8.	Semikontinuierliche Nikkomycinproduktion mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen	68
9.	Vergleichende Nikkomycinproduktion	69
10.	Fermentation, Isolierung und Charakterisierung der neuen Nikkomycine W_x und W_z	71
10.1.	Fermentation und Isolierung	72
10.2.	Charakterisierung	72
10.2.1.	Strukturformeln	72
10.2.2.	Physikalische Daten	73
10.2.2.1.	UV-Spektren	73
10.2.2.2.	pH-Stabilität	74
10.2.3.	Biologische Aktivität	75

IV. **DISKUSSION**

1. Fermentation 76
2. Immobilisierung 84
3. Biogenese und Wirkung 87

V. **ZUSAMMENFASSUNG** 91

VI. **LITERATURVERZEICHNIS** 93

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ATCC	American Type Culture Collection
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
deion.	deionisiert
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ID	Innendurchmesser
ID_{50}	Konzentration, bei der die Enzymaktivität um 50% gehemmt wird
mAU	maximal Absorbance Units
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOP	8-Methoxypsoralen
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NL	Nährlösung
NTG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
P_i	anorganisches Phosphat
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
TG	Trockengewicht
t(h)	Fermentationszeit in Stunden
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin
Tü	Stammsammlung des Instituts für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Universität Tübingen
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vvm	Volumen Luft pro Volumen Nährlösung pro Minute

I. EINLEITUNG

Obwohl immobilisierte Zellen in der Natur häufig zu beobachten sind, ist das Interesse an Verfahren zur 'künstlichen' Immobilisierung erst in den letzten 15 Jahren stark gestiegen. Auf der 'First Enzyme Engineering Conference' 1971 wurde dann auch eine Definition gegeben, nach der 'immobilisierte Zellen physikalisch fixierte oder räumlich eingeschlossene Zellen sind, die ihre katalytische Aktivität und - wenn möglich oder notwendig - ihre Lebensfähigkeit bewahrt haben sowie wiederholt und in kontinuierlichem Betrieb eingesetzt werden können'.

Die Methoden, die bei der Zellimmobilisierung angewandt werden, sind im wesentlichen für die Immobilisierung von Enzymen entwickelt worden. Mit ihnen wurde es möglich, Enzyme zu stabilisieren und wiederverwendbar zu machen, eine Grundvoraussetzung, um auch teure und labile Enzyme wirtschaftlich einsetzen zu können (CHIBATA & TOSA, 1983).

Verglichen mit fixierten Enzymen bietet die Anwendung immobilisierter Zellen zusätzliche Vorteile (FUKUI & TANAKA, 1982): Neben allgemein höheren Enzymaktivitäten innerhalb der Zelle entfällt eine mitunter aufwendige Enzymisolierung, instabile oder membrangebundene Enzyme verbleiben in ihrer nativen Umgebung, cofaktorabhängige- und Mehrschritt-Enzymreaktionen laufen entweder nur oder aber effizienter innerhalb der Zelle ab und schließlich sind intakte Zellen in der Lage, Enzyme zu regenerieren. Nachteilig kann sich bei der Zellimmobilisierung die Tatsache auswirken, daß die Zellwand eine zusätzliche Permeationsbarriere darstellt und in Zellen unerwünschte Nebenreaktionen ablaufen können. Außerdem können pro Volumeneinheit weniger Zellen als Enzyme fixiert werden, was geringere Raum-Zeit-Ausbeuten zur Folge hat.

Die inzwischen über 100 beschriebenen Methoden zur Immobilisierung von Zellen lassen sich in die folgenden Kategorien einteilen (KLEIN & WAGNER, 1983):

1. Physikalische Quervernetzung (Flokkulation)
2. Kovalente Vernetzung
3. Adsorption an Träger
4. Kovalente Bindung an Träger
5. Geleinschluß
6. Mikroverkapselung

Die am weitaus häufigsten eingesetzte Methode ist die Immobilisierung durch Geleinschluß (FUKUI & TANAKA, 1982); sie ist universell einsetzbar und sehr schonend, wodurch die volle Lebensfähigkeit der Zellen erhalten bleibt. Als Matrix eignen sich synthetische (z.B. Polyacrylamid) oder natürliche Polymere, letztere beruhen fast ausschließlich auf Polysaccharidbasis, wie beispielsweise Alginat, Carrageenan oder Chitosan (VORLOP & KLEIN, 1983).

Trotz einer Vielzahl von Arbeiten über Zellimmobilisierung (KENNEDY & CABRAL, 1983) werden bisher nur wenige Verfahren industriell genutzt; sie sind in Tabelle 1 aufgelistet (FERLAN, 1984). Bei den angeführten Verfahren handelt es sich fast ausschließlich um Stoffumwandlungen in Einschritt-Reaktionen, die, verglichen mit Mehrschritt-Reaktionen, wesentlich einfacher zu handhaben sind und die sowohl an die Immobilisierung als auch an die Lebensfähigkeit der Zellen geringere Anforderungen stellen.

Als Beispiel für eine komplexe Mehrschritt-Reaktion sei die Synthese von Antibiotika und anderer Sekundärmetabolite angeführt. Obwohl sie die wirtschaftlich bedeutendsten mikrobiellen Produkte darstellen, sind bis jetzt die Möglichkeiten, sie mit immobilisierten Zellsystemen herzustellen, kaum beachtet worden (KARUBE et al., 1984). Bis heute sind nur für

Tabelle 1: Industrielle Anwendung von immobilisierten Zellen

Anwendung	Organismus	Land	Jahr
Raffinosehydrolyse	Mortiella vinacea	Japan	1968
Fructose aus Glucose	Streptomyces spec.	USA	1972
L-Aspartat aus Fumarat	Escherichia coli	Japan	1973
L-Malat aus Fumarat	Brevibacterium ammoniagenes	Japan	1974
Abwasser-Reinigung	Mischkultur	USA	1976
Prednisolon aus Hydrocortison	Curvularia lunata	Schweden	1978
6-Aminopenicillansäure aus Penicillin G	Escherichia coli	UdSSR	--
L-Alanin	Pseudomonas dacunhae	Japan	1982
Ethanol	Saccharomyces spec.	Japan	--

die in Tabelle 2 zusammengestellten Antibiotika Verfahren zur Gewinnung mit fixierten Zellen im Labormaßstab erarbeitet worden.

Das von VEELKEN & PAPE (1982) beschriebene Verfahren zur kontinuierlichen Nikkomycinproduktion erreicht eine beachtliche Langzeitstabilität (über 600 Stunden) und hohe spezifische Bildungsraten.

Bei den Nikkomycinen handelt es sich um Nucleosid-Peptid-Antibiotika, von denen in der Zwischenzeit über 25 ähnliche Verbindungen beschrieben worden sind. Diese 'Variation über ein Thema' ist für Sekundärmetabolite typisch (ZÄHNER, 1979).

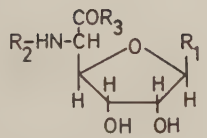
Die von Streptomyces tendae ETTLINGER Tü 901 gebildeten Nikkomycine wurden in einem Screening nach antifungischen Substanzen entdeckt und von HÖHNE (1974) und DEHLER (1979) aus dem Kulturfiltrat isoliert. Die Strukturaufklärung erbrachte

Tabelle 2: Antibiotikaherstellung mit immobilisierten Zellen

Produkt	Organismus	Literatur
Penicillin G	Penicillium chrysogenum	MORIKAWA et al. (1979a)
Bacitracin	Bacillus spec.	MORIKAWA et al. (1979b)
Candicidin	Streptomyces griseus	VENKATASUBRAMANIAN & VIETH (1979)
Cephamycin	Streptomyces clavuligerus	FREEMAN & AHARONOWITZ (1981)
Nikkomycin	Streptomyces tendae	VEELKEN & PAPE (1982)
Nisin	Streptococcus lactis	EGOROV et al. (1978)
Patulin	Penicillium urticae	DEO & GAUCHER (1983)
Thienamycin	Streptomyces cattleya	BAKER et al. (1982)
Tylosin	Streptomyces spec.	VEELKEN & PAPE (1982)

den Beweis, daß es sich um neue, in die Gruppe der Nucleosid-Peptid-Antibiotika gehörende Verbindungen handelt (DÄHN et al., 1976; HAGENMAIER et al., 1979; KÖNIG et al., 1980). Die Strukturen aller bisher bekannten Nikkomycine sind in Abbildung 1 dargestellt.

Alle biologisch aktiven Nikkomycine sind aus einer 5-Aminohexuronsäure aufgebaut, an die N-glycosidisch eine Base, entweder Uracil oder 4-Formyl-4-Imidazolin-2-on, und über eine Peptidbindung eine ungewöhnliche L-Aminosäure gebunden sind. Im Falle der Nikkomycine Z, X, I und J ist das Nucleosid mit Hydroxypyridylhomothreonin verknüpft; bei den Nikkomycinen B und B_x ist an dessen Stelle Hydroxyphenylhomothreonin eingebaut. An die freie Carboxylgruppe der 5-Aminohexuronsäure kann zusätzlich L-Glutaminsäure peptidisch gebunden sein; diese ist bei Q_x/Q_z durch Homoserin ersetzt (BORMANN et al., 1985).



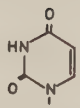
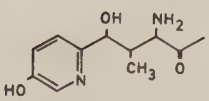
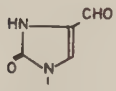
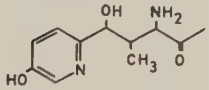
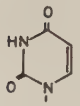
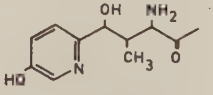
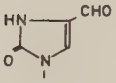
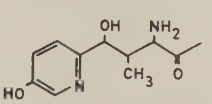
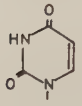
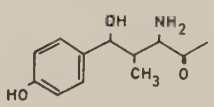
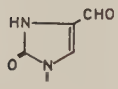
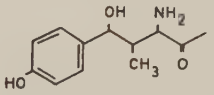
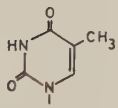
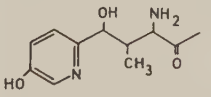
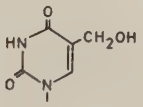
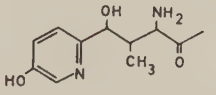
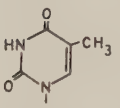
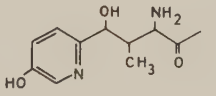
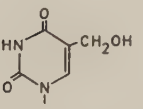
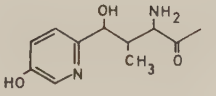
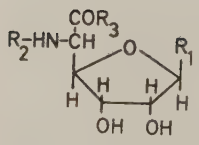
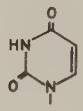
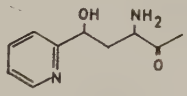
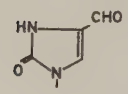
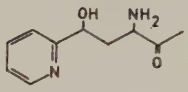
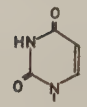
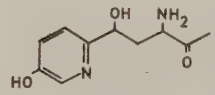
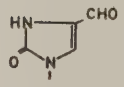
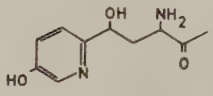
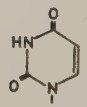
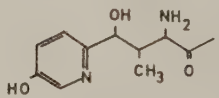
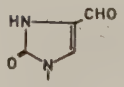
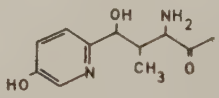
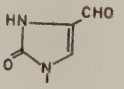
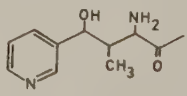
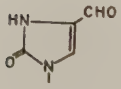
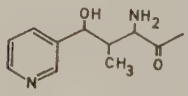
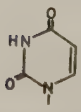
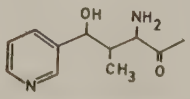
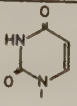
NIKKOMYCIN	R_1	R_2	R_3
Z			OH
X			OH
J			Glu
I			Glu
B			OH
B_X			OH
Z_T			OH
Z_H			OH
J_T			Glu
J_H			Glu

Abb. 1: Strukturformeln der Nikkomycine

Abb. 1: Strukturformeln der Nikkomycine (Fortsetzung)



NIKKOMYCIN	R_1	R_2	R_3
K_Z			OH
K_X			OH
O_Z			OH
O_X			OH
Q_Z			Homo-Ser
Q_X			Homo-Ser
P_X			OH
R_X			Glu
R_Z			Glu
N		H	Glu

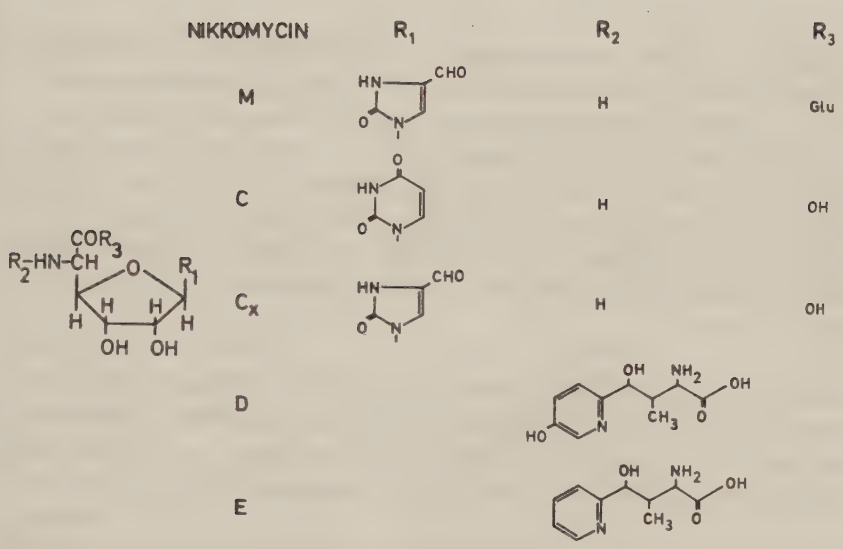


Abb. 1: Strukturformeln der Nikkomycine (Fortsetzung)

Über Mutasynthese und gerichtete Fermentation konnte DELZER (1983) die im Basenteil modifizierten Nikkomycine Z_T, Z_H und die entsprechenden Tripeptide erhalten, bei denen zugefüttertes Thymin bzw. Hydroxymethyluracil als Base eingebaut wurde.

Ebenfalls in die Gruppe der Nucleosid-Peptid-Antibiotika gehören die Polyoxine und Neopolyoxine, letztere sind mit den Nikkomycinen identisch (KOBINATA et al., 1980; URAMOTO et al., 1980). Die in Japan bereits 1965 entdeckten Polyoxine (ISONO et al., 1965) besitzen denselben Nucleosidteil, dessen Base Uracil zusätzlich modifiziert sein kann. An die Aminogruppe der Aminohexuronsäure ist eine Carbamoylpolyoxamsäure gebunden; die freie Carboxylgruppe des Zuckers kann zusätzlich mit Polyoximsäure verknüpft sein (ISONO & SUZUKI, 1979; URAMOTO et al., 1981).

Nikkomycine und Polyoxine hemmen als strukturanaloge Verbindungen zu UDP-N-Acetylglucosamin kompetitiv die Chitin-Syn-

thase bei Pilzen (BRILLINGER, 1979; MÜLLER et al., 1981; DELZER et al., 1984; ENDO et al., 1970; GOW & SELITRENNIKOFF, 1984), Insekten (COHEN & CASIDA, 1982), Entamoeben (AVRON et al., 1982) und Diatomeen (GOODAY et al., 1985). Darüberhinaus konnte ZOEBELEIN (1979, 1981) für Nikkomycin Z/X eine gute akarizide Wirkung gegen Spinnmilben feststellen und bei Verfütterung an Dipteren ließ sich bei reduzierter Eizahl eine fast vollständige Sterilität der Eier erreichen (ZOEBELEIN & KREHAU, 1983).

Die Suche nach weiteren Nikkomycinen konzentriert sich in erster Linie darauf, noch aktivere oder aber physikalisch stabilere Verbindungen zu finden. Die Methoden, die dafür in Frage kommen, sind bei DELZER (1983) beschrieben.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten neuen Nikkomycine K und O wurden aus dem Kulturfiltrat einer Mutante mit verändertem HPLC-Spektrum isoliert (BORMANN et al., 1985). Der mit Tü 901/395 bezeichnete Stamm produziert neben Nikkomycin K und O noch Z und X mit den entsprechenden Tripeptiden, ein davon abgeleiteter Stamm (Tü 901/395/11) synthetisiert jedoch nur noch Nikkomycin K und O. Diese weisen einen modifizierten Aminosäureteil auf, wobei den Nikkomycinen O_X/O_Z die Methylgruppe und K_X/K_Z zusätzlich die Hydroxygruppe am Pyridylring fehlen. Beide Nikkomycine zeigen zwar eine höhere pH-Stabilität, sind aber im biologischen Test gegen Pilze deutlich weniger aktiv (BORMANN et al., 1985). Die insektizide und akarizide Wirkung ist im selben Maße reduziert (ZOEBELEIN, persönliche Mitteilung, 1983).

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Nikkomycin K- und O-Produktion zu optimieren und Untersuchungen zu deren Regulation durchzuführen. Darüberhinaus sollten die Grundlagen erarbeitet werden, sie mit Hilfe von immobilisierten Zellen in einem definierten Produktionsmedium herstellen zu können.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Soweit nicht gesondert aufgeführt, wurden analysenreine Substanzen der Fa. Merck AG, Darmstadt, verwendet.

Boehringer Mannheim	UV-Test: Stärke
BP-Chemicals, Düsseldorf	Polyol PPG 2025
Deutsche Ajinomoto GmbH, Hamburg	L-Asparaginmonohydrat L-Isoleucin
Deutsche Maizenawerke, Hamburg	Cerelose (D-Glucose) Mannit, Stärke
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto Agar
EGA Chemie, Keppler & Reiff, Steinheim, Albuch	NTG
Fluka, Buchs, Schweiz	Calciumchlorid-Dihydrat Natriumhexametaphosphat
Hedinger, Stuttgart	Hyphlo Supercel (Celit) Natriumhypochlorid
Heess GmbH & Co., Stuttgart	Sojaöl, raffiniert
Hellmuth Carroux, Hamburg	Protanal LF 20/60 (Na-Alginat) Komplex-Agar (Span-Agar)
Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen	Diagnostica-Test: anorganischer Phosphor
Oxoid Deutschland, Wesel	Fleischextrakt, Hefeextrakt, Malzextrakt
Roth KG, Karlsruhe	Alginsäure-Natriumsalz
Schoenenberger, Magstadt	Sojamehl
Serva Feinbiochemica, Heidelberg	MOPS, Span 85, Tricin, Tween 80
Sigma Chemie GmbH, München	Fluortyrosin, MES, Uracil

2. Nährmedien

Alle Nährmedien wurden 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Der pH-Wert wurde jeweils vor dem Sterilisieren mit NaOH bzw. HCl eingestellt. Die Gewichtsangaben beziehen sich auf 1 l Wasser. Bei chemisch definierten Medien wurde entionisiertes Wasser verwendet.

2.1. Medien für Stammhaltung und Testplatten

Medium 1	Hefeextrakt	4,0 g
	Malzextrakt	10,0 g
	Glucose	4,0 g
	Komplex-Agar	20,0 g
	pH 7,3	

Medium 2	Pepton	5,0 g
	Fleischextrakt	3,0 g
	NaCl	2,5 g
	Komplex-Agar	20,0 g
	pH 7,2	

Medium 3 (Minimalmedium nach HOPWOOD et al., 1977)

Glycerin	10,0 g
K_2HPO_4	1,0 g
L-Asparagin	1,0 g
Spurenelemente-Lösung	2 ml
pH 7,0	

Spurenelemente-Lösung	
$ZnCl_2$	40 mg
$CuCl_2 \times 2\ H_2O$	10 mg
$FeCl_3 \times 6\ H_2O$	200 mg
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	10 mg
$Na_2B_4O_7 \times 10\ H_2O$	10 mg
Deion. Wasser	1000 ml

2.2. Produktionsmedien

Medium 4 (DEHLER, 1979)

Sojamehl	20,0 g
Mannit	30,0 g
Stärke	10,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
pH 7,0	

Medium 5

Sojamehl	20,0 g
Mannit	20,0 g
Stärke	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g

Medium 6 (verändert nach DELZER, 1983)

Mannit	20,0 g
L-Asparagin	1,6 g
MES (50 mM)	9,8 g
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	10 mg
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	100 mg
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	20 mg
KCl	100 mg
$CaCl_2$	100 mg
pH 5,5	

Medium 7	Glucose*	30,0 g
	$(NH_4)_2SO_4$	0,5 g
	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	100 mg
	KCl	200 mg
	$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	10 mg
	pH 5,5	

Medium 8	entspricht Medium 7 jedoch:	
	Glucose*	60,0 g

* Die Glucose wurde getrennt autoklaviert.

3. Mikroorganismen

3.1. Nikkomycinproduzenten

Streptomyces tendae ETTLINGER Tü 901/8c
Streptomyces tendae ETTLINGER Tü 901/395/11
Streptomyces tendae ETTLINGER Tü 901/395/11/32

3.2. Testorganismen		Medium	Temp. (°C)
Zygomycetes			
Mucor hiemalis (+) WEHMER	Tü 179	1	20
Mucor hiemalis (-) WEHMER	Tü 180	1	20
Mucor miehei COONEY et EMERSON	Tü 284	1	37
Mucor racemosus	DSM 62760	1	27

Ascomycetes und Deuteromycetes		Medium	Temp. (°C)
Alternaria kikuchiana TANAKA	Tü 169	2	27
Arthrinium phaeospermum	Tü 159	1	27
Aspergillus fumigatus FRESENIUS	Tü 149	1	37
Aspergillus viride-mutans		1	27
Botrytis cinerea PERSOON ex FRIES	Tü 157	1	24
Candida albicans (ROBIN) Berkhout	Tü 164	1	27
Candida guilliermondii (CASTELLANI)	CBS 6021	1	27
Chaetomium globosum KUNZE & FRIES	Tü 138	1	27
Corticium sasakii	Tü 8008	1	27
Dipodascus magnusii	Tü 167	1	27
Neurospora crassa SHEAR & DODGE		1	27
Paecilomyces variotii BAINIER	Tü 137	1	37
Penicillium notatum	Tü 136	1	27
Phoma spec.	Tü 649	1	27
Pyricularia oryzae	Tü 692	1	27
Rhodotorula rubra	Tü 8093	1	27
Saccharomyces cerevisiae HANSEN	Tü 125	1	27
Sordaria macrospora AUERSWALD	Tü 128	1	27
Trichophyton mentagrophytes (ROBIN) BLANCHARD	Tü 510	1	27
Wingea robertsii (VAN DER WALT) VAN DER WALT	DSM 70870	1	27
Yarrowia lipolytica	ATCC 8662	1	27

4. Kulturbedingungen Tü 901

4.1. Stammhaltung und -aufbewahrung

Schrägröhrchen mit Medium 1 wurden mit Sporen der Stämme beimpft, bis zur Sporulation bei 27°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Zur Isolierung von Einzelkolonien dienten Platten mit Medium 1.

4.2. Sporengewinnung

Die Oberfläche der mit 100 ml Medium 1 gefüllten Schrägagarkolben (500 ml-Erlenmeyerkolben) wurde mit Sporen aus Schrägröhrchen beimpft und bis zur Sporulation etwa 10 Tage bei 27°C inkubiert. Die Sporen wurden mit tweenhaltiger Saline (1 Tropfen/100 ml) abgeschwemmt und in einen mit Glasperlen gefüllten Kolben überführt. Um die Sporenketten zu zerschlagen, wurde mit 120 Upm geschüttelt und mit Ultraschall behandelt. Die Sporensuspension wurde über Glaswolle gereinigt, zweimal mit kalter Saline gewaschen und, in Glycerin (Endkonzentration 30%) mit flüssigem Medium 1 vermischt, bei -70°C konserviert. Die Titerbestimmung erfolgte nach entsprechender Verdünnung in Saline auf Platten mit Medium 1.

4.3. Schüttelkulturen

Alle Schüttelkolbenversuche wurden in Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich (Schikane) durchgeführt. 500 ml-Kolben enthielten 100 ml, 100 ml-Kolben 20 ml Medium und wurden mit Sporen von Schrägröhrchen beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 27°C und 120 Upm auf einer rotierenden Schüttelmaschine (RC 106, Infors AG, Basel, Schweiz).

4.4. 'resting-cell' Kulturen

4.4.1. Herstellung der Zellsuspension

Schüttelkulturen (100 ml Medium 5, 40 bis 42 Stunden wie unter II.4.3. beschrieben inkubiert) wurden über eine Filternutsche geerntet, mit sterilem deion. Wasser auf dem Filter (MN 615, Ø 18,5 cm, Machery & Nagel, Düren) gewaschen und in 30 ml deion. Wasser je 100 ml Vorkultur resuspendiert. Die Trockengewichtsbestimmung erfolgte wie in II.5.1. beschrieben.

4.4.2. 'resting-cell' Schüttelkulturen

100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane und 10 ml Medium 6, 7 bzw. 8 wurden mit 5 ml Zellsuspension (II.4.4.1.) beschickt und wie bei II.4.3. angegeben inkubiert.

4.4.3. 'resting-cell' Kulturen im Blattrührfermenter

Zur Herstellung der Zellsuspension für den Rührfermenter wurden 25 Schüttelkulturen wie in II.4.4.1. beschrieben geerntet, gewaschen, in 750 ml deion. Wasser resuspendiert und in eine 2l-Duranflasche überführt. Diese war mit Oliven versehen und konnte über eine Schlauchverbindung steril an den Fermenter (II.4.6.1.2.) angeschlossen und damit die Zellsuspension problemlos überführt werden. Die Fermentationsbedingungen sind unter II.4.6.2.2. angegeben.

4.5. Immobilisierung durch Einschluß in Calciumalginat-Gel

4.5.1. Immobilisierung von Zellen

a) mit Hilfe von Spritzenkanülen (verändert nach VEELKEN, 1983)

5 ml Zellsuspension (II.4.4.1.) wurden mit 10 ml einer 3%-igen Natriumalginat-Lösung (20 Minuten bei 121^{o}C autoklaviert) gemischt und mit einer Spritze in 50 ml Calciumchlorid-Lösung (2,5%) getropft. Der Innendurchmesser der Kanüle (1,2 mm) und die Tropfgeschwindigkeit bestimmten im wesentlichen den Durchmesser der Gelkugeln (ca. 3 mm). Zur Herstellung kleinerer Kugeln wurden Kanülen mit geringerem Innendurchmesser verwendet. Die Calciumalginat-Kugeln blieben mindestens 60 Minuten zum Aushärten in der Calciumchlorid-Lösung. Die Gelkugeln wurden in einer Filternutsche mit etwa 100 ml deion. Wasser gewaschen und anschließend in einem mit

15 ml Medium 6 gefüllten Erlenmeyerkolben (100 ml, 1 Schikane) bei 27°C und 120 Upm inkubiert.

b) im Zweiphasensystem
Nach der von NILSSON et al. (1983) beschriebenen Methode ist es möglich, die mit Natriumalginat-Lösung vermischten Zellen in einer hydrophoben Phase als wässrige Tröpfchensuspension zu erhalten und mit $CaCl_2$ zu fixieren.
Dazu wurden 10 ml 3%-ige Natriumalginat-Lösung mit 5 ml Zellsuspension (II.4.4.1.) vermischt und in 25 ml raffiniertes Sojaöl gegeben, dem ein Emulgator (Span 85) in einer Konzentration von 0,1% zugesetzt war. Durch kräftiges Rühren entstanden Tröpfchen, deren Größe sich über die Rührgeschwindigkeit einstellen ließ und die durch Zugabe von 75 ml $CaCl_2$-Lösung (2,5%) vernetzt wurden. Nach 15 minütigem Rühren wurde der Überstand mit der Ölphase dekantiert und durch frische $CaCl_2$-Lösung ersetzt, in der die Alginat-Kugeln ca. eine Stunde zum Aushärten verblieben. Das Gel wurde wie oben beschrieben gewaschen und inkubiert.

4.5.2. Immobilisierung von Sporen

a) Sporen (II.4.2.) in einer Endkonzentration von $5x10^4$/ml wurden mit 10 ml einer 3%-igen Natriumalginat-Lösung (Roth AG, Karlsruhe) gemischt und in 50 ml Calciumchlorid-Lösung (2,5%) getropft. Durch Verwendung von Spritzenkanülen mit 1,2 mm Innendurchmesser wurden wieder Gelkugeln mit etwa 3 mm Durchmesser erhalten. Nach mindestens einstündigem Aushärten wurde das Gel wieder über eine Filternutsche mit ca. 100 ml deion. Wasser gewaschen, in mit 50 ml Medium 5 gefüllte 500 ml-Kolben (1 Schikane) überführt und für 55 Stunden bei 27°C und 120 Upm inkubiert.

b) Nach erfolgter Optimierung wurde folgendes Immobilisierungsschema angewendet: In 20 ml 3,5%-iges Natriumalginat (Protanal LF 20/60) wurden $2,5x10^4$ Sporen /ml pipettiert, vermischt, mittels Schlauchpumpe (Epsom 25201, F.A. Hughes & Co., Ltd.) und der in Abbildung 2 dargestellten Düse in 100 ml 2,5%-ige $CaCl_2$-Lösung getropft. Gleichzeitig strömte sterile Luft an der Kanüle entlang und löste die Tropfen an der Kanülenöffnung ab. Die Geschwindigkeit des Luftstroms bestimmte die Größe der Gelkugeln; diese wurde auf etwa 1,5 mm Durchmesser eingestellt. Das Waschen, das Aushärten des Gels und die Inkubation erfolgten wie oben beschrieben, allerdings in 500 ml Erlenmeyerkolben ohne seitlichen Einstich.

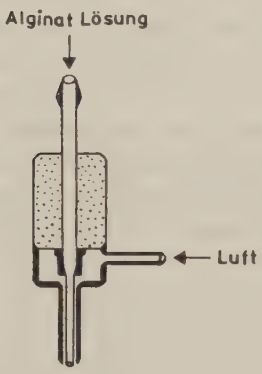


Abb. 2: Schematische Darstellung der Immobilisierungsdüse

Diese 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen wurden über ein Sieb (Porenweite 0,8 mm) geerntet, mit deion. Wasser vorgewaschen, in eine Filternutsche überführt und erneut gut gewaschen. In mit 15 ml Medium 6 bzw. 7 gefüllten 100 ml-Erlenmeyerkolben (1 Schikane) wurden, wenn nicht besonders aufgeführt, 7 g Gel eingewogen und inkubiert (siehe II.4.3.).

4.5.3. Semikontinuierliche Fermentation mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen

Bei semikontinuierlicher Prozeßführung wurde das verbrauchte Medium mit einer 10 ml-Pipette abgesaugt, deren breite Öffnung mit einem Drahtnetz verschlossen war. Dadurch war es möglich, Gelabrieb und eventuell freies Myzel zu entfernen. Anschließend konnte das Gel mit 50 ml deion. Wasser gewaschen und in 15 ml frischem Medium wie in Abschnitt II.4.3. angegeben weiterinkubiert werden.

4.5.4. Sporenimmobilisierung im Blattrührfermenter (Biostat S/V)

Zur Sporenimmobilisierung im Fermenter wurden 800 ml Natriumalginat-Lösung (3,5%, Protanal LF 20/60) mit $5x10^4$ Sporen/ml versetzt und wiederum mit der oben beschriebenen Schlauchpumpe über eine Spritzenkanüle (ID=0,6) in den Fermenter getropft, der mit 3 l 2,5%-iger $CaCl_2$-Lösung gefüllt war. Die Alginatperlen blieben zum Aushärten über Nacht in $CaCl_2$, wurden dann mit 7 l deion. Wasser gewaschen und unter folgenden Bedingungen fermentiert:

Medium:	1,2 l Medium 5
Belüftung:	2 l/min (1 vvm)
Temperatur:	27°C
Drehzahl:	200 Upm
Gesamtvolumen:	2 l

Nach 66 Stunden wurde das Komplexmedium entfernt, das Gel mehrmals mit insgesamt 10 l deion. Wasser gewaschen und in 1,2 l Medium 6 weiterinkubiert.

4.5.5. Bestimmung der Gelkugelgröße

Bei der Variation der Gelkugelgröße wurde der Durchmesser von etwa 100 Gelkugeln pro Ansatz mit einer Meßlupe bestimmt und deren Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

4.5.6. Auflösen des Calciumalginat-Gels

Zur Bestimmung des Trockengewichts immobilisierter Zellen ist es notwendig, das Gel vollständig aufzulösen. Hierzu wurden die Gelperlen von 10 ml Alginat-Lösung in 30 ml 2%-ige Natriumhexametaphosphat-Lösung mindestens 30 min. auf dem Magnetrührer gerührt. Die Trockengewichtsbestimmung erfolgte wie unter II.5.1. beschrieben und wurde in g TG/kg Gel angegeben.

4.6. Fermentation

4.6.1. Fermenterbeschreibung

4.6.1.1. Biostat E (10 l Blattrührfermenter)

Bei Fermentationen mit komplexem Medium 5 kam ein Blattrührfermenter vom Typ Biostat E (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) zum Einsatz. Die technische Grundausstattung bestand aus:

- Drehzahlregulierung
- Temperaturregelung mit Thermofühler Pt 100
- 'in situ' sterilisierbarer Blattrührfermenter (Antrieb unten) mit 10 l Arbeitsvolumen
- pH-Messung (sterilisierbare pH-Elektrode, Typ 465-VT, Fa. Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz)
- pH-Regelung mit Säure-Lauge-Registrierung
- integrierte, vom pH-Regler ansteuerbare Schlauchpumpen mit Säure-Lauge-Vorlagegefäßen

- pO_2-Messung (sterilisierbare, polarographische Sauerstoff-Elektrode, Typ IL 531, Fa. Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz)
- pO_2-Regelung, wahlweise über die Belüftungsrate und/oder die Drehzahl
- 6-Kanal-Punktschreiber (Typ Minicomp TP./144, Fa.Hartmann & Braun, Frankfurt)
- Strömungsmeßrohr (Rotameter)
- mit Dampf sterilisierbares Probenahmeventil

Zusätzlich konnten folgende Meßgeräte angeschlossen werden:
- Laborgasmeter (Typ L5-PVC, Fa. Wohlgroth, Zürich, Schweiz)
- Abluftanalyse bestehend aus:
  a) Sauerstoff-Meßgerät (Oxygor 6N, Fa. Maihak, Hamburg)
     Meßprinzip: Messung der Widerstandsveränderung aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften von Sauerstoff
  b) Kohlendioxid-Meßgerät (Unor 6N, Fa. Maihak, Hamburg)
     Meßprinzip: Konzentrationsabhängige Infrarotabsorption des Kohlendioxids

4.6.1.2. Biostat S/V (6 l Blattrührfermenter)

batch-Fermentationen mit 'resting-cells' wurden in Blattrührfermentern des Typs Biostat S (Antrieb oben) und Biostat V (Antrieb unten) der Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen mit einem Gesamtvolumen von 6 l durchgeführt. Das Arbeitsvolumen betrug 2,5 l. Die technische Ausstattung entsprach weitgehend der des Biostat E (II.4.6.1.1.), außer daß
- die Temperaturregelung über externe Thermostaten ohne Thermofühler (Pt 100) durchgeführt wurde,
- die pH-Regelung über extern ansteuerbare Membranpumpen (FE 211, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) erfolgte und
- eine pO_2-Regelung nicht möglich war.

Die Sterilisation dieser Fermenter erfolgte im Autoklaven bei 121°C für 20 Minuten.

4.6.2. Fermentationsbedingungen

4.6.2.1. Biostat E

Dem mit 9,5 l Medium 5 gefüllten Fermenter wurden vor dem Sterilisieren 2 ml Polyol zugesetzt, um eine Schaumbildung zu verhindern. Nach der Sterilisation und dem Erreichen der Betriebsparameter wurde mit 500 ml Vorkultur (27 bis 30 Stunden alte Schüttelkulturen) beimpft und bei folgenden Bedingungen fermentiert:

Belüftung:	0,5 vvm	
Temperatur:	27°C	
Drehzahl:	500 Upm	
pH:	5,5	vor dem Sterilisieren mit 3N H_2SO_4 eingestellt bzw. mit 3N H_2SO_4 und 3N NaOH konstant gehalten.
Dauer:	160-180 Stunden	

4.6.2.2. Biostat S/V

Für Untersuchungen zur Regulation wurden die für Schüttelkulturen ermittelten Parameter für den Biostat S/V übernommen. Im einzelnen wurden folgende Bedingungen gewählt:

Belüftung:	2 l/min (0,8 vvm)
Temperatur:	27°C
Drehzahl:	300 Upm
Medium:	1,5 l Medium 8 mit 0,5 ml Polyol
Zellsuspension:	1 l (siehe Abschnitt II.4.4.3.)
Gesamtvolumen:	2,5 l
Dauer:	100-120 Stunden

5. Fermentationsanalysen

5.1. Myzeltrockengewicht

Zur Bestimmung des Myzeltrockengewichts wurden 5 ml Kultur über zuvor abgewogene Filter (MN 615, ⌀ 4,5 cm, Fa. Machery & Nagel, Düren) abgesaugt. Wie bei der Bestimmung des Leergewichts wurden die Filter über Nacht bei 100°C getrocknet und nach einstündigem Temperaturausgleich bei Raumtemperatur gewogen. Die Differenz beider Messungen ergab das Myzeltrockengewicht.

5.2. Nikkomycinbestimmung

5.2.1. Plattendiffusionstest

Der Plattendiffusionstest mit Mucor hiemalis (Tü 179/180) gibt lediglich die Gesamtaktivität aller biologisch wirksamen Nikkomycine wieder und erlaubt keine Aussagen über die Zusammensetzung des Nikkomycinspektrums. Die Ausführung ist bei KIRST (1971) beschrieben.

5.2.2. Analytische HPLC

Die analytische HPLC ermöglicht es, alle bisher beschriebenen Nikkomycine im Kulturfiltrat quantitativ in einem Lauf zu erfassen. Das HPLC-System wurde von FIEDLER (1981) für die Routineanalytik entwickelt. Das derzeit verwendete System ist bei FIEDLER (1984) beschrieben, vergleichende HPLC-Diagramme sind bei BORMANN et al. (1985) dargestellt.

5.3. Stärkebestimmung

Zur Stärkebestimmung diente ein Enzymtest der Fa. Boehringer, Mannheim.

5.4. Glucosebestimmung

Der Glucosegehalt im Kulturfiltrat wurde enzymatisch mit einem Reagenziensatz der Fa. Merck, Darmstadt, bestimmt.

5.5. Mannitbestimmung

Die Mannitbestimmung erfolgte über HPLC, wobei jeweils 20 µl Kulturfiltrat aufgetragen wurden.
Aufbau der Anlage:

Pumpe:	Knauer HPLC-Pumpe Typ 52.00
Detektor:	Melz LCD 201 (Bischoff, Leonberg)
Integrator:	Hewlett Packard Modell 3380
Säule:	Nucleosil-NH_2, 5 µm Partikel (125 x 4,6 mm)
Bedingungen:	
Fließmittel:	Acetonitril/Wasser 8:2, isokratisch
Fließrate:	150 ml/h

Die Kalibrierung erfolgte extern.

5.6. Phosphatbestimmung

Mit Hilfe eines Reagenziensatzes (Fa. Roche Diagnostica) war es möglich, die Phosphatkonzentration photometrisch zu bestimmen.

5.7. Stickstoffbestimmung

a) Gesamtstickstoff

Der Gesamtstickstoffgehalt im Kulturfiltrat wurde nach der Mikro-Kjeldahl-Methode bestimmt. Die Ammoniakdestillation erfolgte mit Hilfe einer automatischen Destillationseinheit der Fa. Tecator, Rodgau, Modell Kjeltec System II.

b) Ammonium-Ionen

Die Bestimmung der NH_4^+-Ionen erfolgte nach der Methode von FAWCETT & SCOTT (1960), wobei durch Ammonium in Gegenwart von Phenol-Nitroprussid und alkalischer Hypochlorid-Lösung ein blauer Indophenolfarbstoff entsteht. Der Test wurde mit einem Zehntel der angegebenen Mengen in Mikrotitergefäßen durchgeführt.

6. Fettsäurenanalyse

Die Fettsäurenanalyse wurde mit 72 Stunden alten 'resting-cell' Kulturen von Tü 901/8c nach der bei DREHER (1978) beschriebenen Methode durchgeführt. Nach Extraktion und Herstellung der Fettsäuremethylester erfolgte die Bestimmung über Gaschromatographie.

7. Mutagenese und Gewinnung von Resistenzmutanten

Sporen des Nikkomycinproduzenten Tü 901/395/11 wurden einer NTG-Mutagenese unterzogen, die über eine Absterbekurve kontrolliert wurde. Die Durchführung ist bei LANGHÄRIG (1981) beschrieben. Zur Selektion auf Resistenz gegen Antimetabolite wurden Sporen des Zeitwertes mit einer Überlebensrate von 1% auf Platten mit Medium 3 ausgestrichen, denen Fluortyrosin in einer Konzentration von 10 µg/ml zugesetzt worden war. Nach Überprüfung der Analogresistenz einzelner Kolonien wurden

diese auf Platten mit Medium 1 angezogen und ihre Nikkomycinproduktion untersucht.

8. Isolierung und Charakterisierung von Nikkomycin W

8.1. Aufarbeitung von Nikkomycin W

Die Isolierung erfolgte nach dem von DELZER (1983) optimierten Aufarbeitungsschema, wobei auf die LiChroprep RP 8-Säule und die präparative HPLC verzichtet wurde.

8.2. Barbitursäure-Reaktion

Barbitursäure wurde als selektives Aldehydreagenz für Nikkomycine der X-Reihe beschrieben (DELZER, 1983). Die Zugabe von 150 µl Barbitursäure (1 g/150 ml, pH 7.0) zu 850 µl nikkomycinhaltiger Lösung führt zu einer Rotfärbung, und über HPLC sind die Nikkomycine mit der Imidazolbase nicht mehr nachweisbar.

8.3. UV-Spektren

Mit der Photo-Dioden-Array-Detektion ist es möglich, während eines HPLC-Laufes UV-Spektren einzelner Peaks aufzunehmen. Der Aufbau der Anlage und deren Einsatz bei der Suche nach neuen Nikkomycinen ist bei FIEDLER (1984) beschrieben.

8.4. Stabilitätstest

Die pH-Stabilität wurde in verschiedenen Pufferlösungen (je 50mM MES pH 5,5; MOPS pH 7,0 und Tricin pH 8,0) bei 20°C getestet und über HPLC ausgewertet.

8.5. Vergleichendes Wirkungsspektrum

Die antifungische Aktivität von Nikkomycin $W_{x,z}$ wurde im Vergleich zu Nikkomycin X und O_x im Plattendiffusionstest (II.5.2.1.) mit verschiedenen Methoden untersucht:

- Vegetative Zellen einer Übernachtkultur (1 ml) wurden in 200 ml Medium 1 eingegossen.
- Sporen von gut gewachsenen Schrägröhrchen wurden mit tweenhaltiger Saline (10 ml) geerntet, über Glaswatte gereinigt und davon 1 ml Sporensuspension mit 200 ml Medium 1 vermischt.
- Myzelstücke nicht sporulierender Pilze wurden mit einem Korkbohrer (Ø 6 mm) ausgestochen, auf Platten (Medium 1) gelegt und so lange inkubiert, bis der Koloniendurchmesser etwa 25 bis 30 mm erreicht hatte. Die Testrondellen wurden an den Wachstumsrand der Riesenkolonien gelegt und nach erneuter Inkubation die Hemmzonen ausgemessen.

Die MHK-Werte wurden durch Extrapolation auf den theoretischen 'Null-Hemmhof-Durchmesser' berechnet, wobei Antibiotikakonzentrationen von 1000, 300, 100, 30, 10 µg/ml eingesetzt wurden.

III.ERGEBNISSE

1. Stammbeschreibung

Der Nikkomycinproduzent Tü 901 wird der Art Streptomyces tendae ETTLINGER zugeordnet. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm Tü 901/395/11 ging aus einer Protoplastierung des bei BORMANN et al. (1985) beschriebenen Stammes Tü 901/395 hervor. Letzterer war nach einer UV/MOP-Mutagenese aufgrund eines veränderten HPLC-Spektrums aufgefallen und als Produzent der neuen Nikkomycine K und O beschrieben worden. Im Gegensatz zu diesem Stamm, der neben den Nikkomycinen K und O noch Z und X produziert, werden von Tü 901/395/11 nur noch die Nikkomycine K und O mit den entsprechenden Tripeptiden gebildet.
Weitere Untersuchungen von BORMANN (persönliche Mitteilung, 1985) ergaben, daß das Nikkomycinmuster von Tü 901/395 genetisch instabil ist. Von 171 getesteten Einzelkolonien, die nach Verdünnungsausstrich erhalten wurden , zeigten 87% das Produktionsspektrum von Tü 901/395/11 (Nikkomycine K und O), 10% entsprachen dem Wildtyp (Nikkomycine Z und X) und nur 3% wiesen noch das Muster des Ausgangstammes (Nikkomycine K, O, Z und X) auf.

2. Suche nach Überproduzenten

Nach NTG-Mutagenese und Selektion auf Fluortyrosin-Resistenz konnten Klone isoliert werden, die eine bis zu 40% höhere Nikkomycinbildung in Medium 5 aufwiesen. Diese Überproduzenten erwiesen sich allerdings als nicht stabil und gingen nach wiederholtem Testen auf das Niveau des Ausgangsstammes zurück.

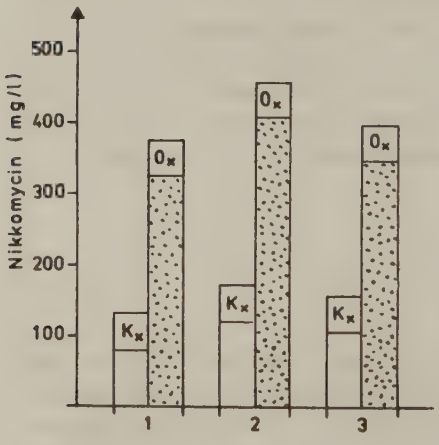
3. Fermentationsoptimierung

3.1. Optimierung des komplexen Produktionsmediums

Das von DEHLER (1979) für den Wildtyp optimierte Komplexmedium diente als Grundlage bei der Suche nach einem geeigneten Produktionsmedium für den Stamm Tü 901/395/11. Die Zusammensetzung dieses Mediums, bestehend aus Stärke, Mannit, Sojamehl und Hefeextrakt, wurde für die Mutante neu optimiert.

3.1.1. Kohlenstoffquelle

Für den Wildtyp Tü 901 konnten die besten Ergebnisse mit 1% Stärke und 3% Mannit erzielt werden. Für die Nikkomycine K und O erwiesen sich je 2% Stärke und Mannit als am günstigsten (Abb.3), wobei mit 1% Stärke nur geringfügig weniger produziert wurde.



1: Mannit 3%, Stärke 1%
2: Mannit 2%, Stärke 2%
3: Mannit 1%, Stärke 3%

Abb. 3: Einfluß verschiedener Stärke- und Mannitkonzentrationen auf die Nikkomycinproduktion in Medium 4 nach 6 Tagen

3.1.2. Stickstoffquelle

a)Sojamehl

DEHLER (1979) konnte zeigen, daß Sojamehl als komplexe Stickstoffquelle durch keine andere zu ersetzen war. Auffallend dabei war, daß nur mit Sojamehl ein pH-Verlauf im schwach sauren Bereich erreicht werden konnte. Dieser Umstand ist sowohl für die Bildung der Nikkomycine als auch für deren pH-Stabilität ausschlaggebend. Mit der Mutante wurde ebenfalls mit 2% Sojamehl die höchste Gesamtausbeute erreicht, für K_x lag das Optimum bei 1,5%, wobei die pH-Werte nur wenig voneinander abwichen (Tab. 3).

Tabelle 3: Nikkomycinproduktion in Abhängigkeit von der Sojamehlkonzentration in Medium 4 nach 6 Tagen

Sojamehl (%)	pH	Nikkomycin (mg/l) K_x	O_x
0,5	5,3	83	231
1,0	5,4	114	314
1,5	5,3	137	363
2,0	5,3	122	415
2,5	5,2	73	344
3,0	5,3	19	216

b) Hefeextrakt

Dem Komplexmedium zugesetzter Hefeextrakt (1%) bewirkte beim Wildtyp nicht nur eine beachtliche Produktionssteigerung, sondern verkürzte zusätzlich die Fermentationszeit. Mehr Hefeextrakt führte bei Schüttelkulturen jedoch wieder zu geringeren Ausbeuten, wobei auch der pH-Wert im neutralen Bereich blieb. Deshalb konnte bei Erhöhung des Hefeextraktanteils auf 2% nur dann eine weitere Ausbeutesteigerung erreicht werden, wenn

der pH-Wert konstant im Sauren gehalten wurde (DEHLER, 1979). Wie in Abbildung 4 dargestellt, konnten diese Ergebnisse für den Wildtyp Tü 910/8c bestätigt werden. Für Nikkomycin X erwies sich 0,75% Hefeextraktanteil als optimal und für Z wurde die höchste Produktion mit 1% erreicht. Nikkomycin O_X war beim Wildtyp nur in geringer Menge nachweisbar; sie nahm jedoch in dem Maße zu, wie der Hefeextraktanteil im Medium reduziert wurde.

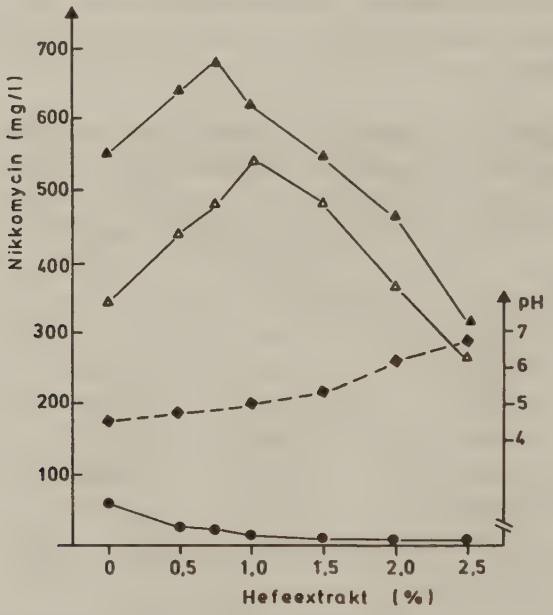


Abb. 4: Einfluß verschiedener Hefeextraktkonzentrationen auf die Nikkomycinbildung und den pH-Wert beim Wildtyp in Schüttelkulturen nach 6 Tagen in Medium 4
Nikkomycin X (-▲-), Z (-△-), O_X (-●-), pH-Wert (--◆--)

Dieselbe Abhängigkeit war bei der Mutante zu beobachten. Konzentrationen über 0,5% hemmten bereits die Bildung von Nikkomycin K und O,unabhängig vom pH-Wert. Bei 1% ging die Pro-

duktion von O_x um etwa 60%, die von K_x sogar um 90% zurück (Abb. 5). In Medium 4 ohne Hefeextrakt fiel die Ausbeute geringfügig niedriger aus; dies wurde auf ein schlechteres Wachstum zurückgeführt.

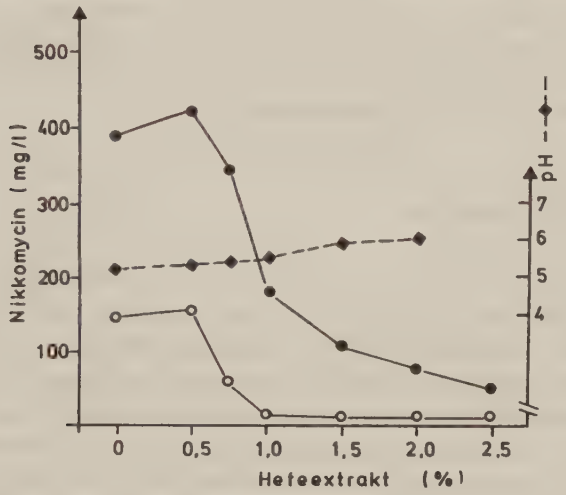


Abb. 5: Produktion von Nikkomycin O_x (—●—) und K_x (—○—) mit der Mutante Tü 901/395/11 bei verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen in Medium 4 nach 6 Tagen

Die als Medium 5 bezeichnete Nährlösung, bestehend aus je 2% Stärke, Mannit und Sojamehl sowie 0,5% Hefeextrakt, war für die Herstellung der Nikkomycine K_x und O_x mit der Mutante am besten geeignet. In Schüttelkulturen wurden damit nach 6 Tagen ca. 450 mg/l O_x, 150 mg/l K_x und 100 mg/l O_z gebildet. Nikkomycin K_z war im Kulturfiltrat nicht nachweisbar. In allen Versuchen lag der Anteil an Nikkomycin C mit etwa 1 g/l sehr hoch, die freie Aminosäure-Seitenkette dagegen konnte nur in geringer Menge nachgewiesen werden.

Alle Optimierungsversuche hatten zum Ziel, möglichst hohe Ausbeuten an Nikkomycin O_x zu erreichen, da diese Verbindung im Vergleich zu Nikkomycin K_x biologisch aktiver ist (BOR-

MANN et al., 1985).
Auf eine weitere Nährlösungsoptimierung wurde verzichtet, da sich die Mutante in ihren Ansprüchen mit Ausnahme vom Hefeextrakt vom Wildtyp nur geringfügig unterschied. Diese und andere Parameter (Belüftung, Temperatur) wurden bereits von DEHLER (1979) umfassend optimiert und für die Kultivierung der Mutante im Fermenter übernommen.

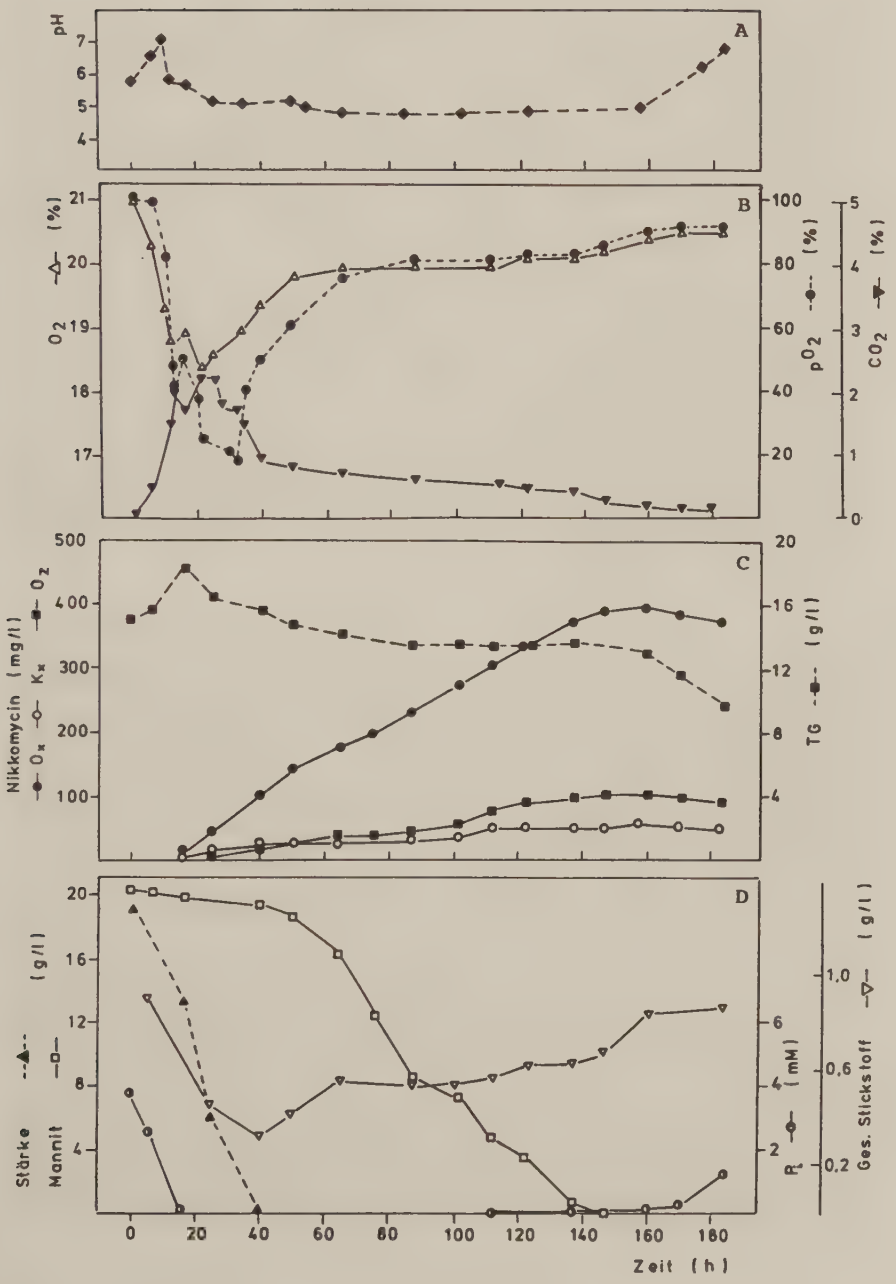
3.2. batch-Fermentation

Mit dem in Abschnitt III.3.1. optimierten Medium wurde eine batch-Fermentation im 10 l Blattrührfermenter (Biostat E) durchgeführt. Neben dem Medium und der Temperatur ist vor allem eine gute Belüftung für die Nikkomycinproduktion wichtig (DEHLER, 1979). Eine ausreichend gute Sauerstoffversorgung konnte mit einer Drehzahl von 500 Upm und einer Belüftungsrate von 0,5 vvm gewährleistet werden. Dies wird aus dem pO_2-Verlauf in Abbildung 6B ersichtlich, wobei der Gelöstsauerstoffgehalt auch in der Phase starken Wachstums nicht unter 15% absinkt.

Bei der Nikkomycinfermentation lassen sich die für den Sekundärstoffwechsel typischen Tropho- und Idiophase unterscheiden (Abb. 6).

Abb. 6: Verlauf einer batch-Fermentation im 10 l Blattrührfermenter (Biostat E) in Medium 5
A: pH-Verlauf
B: Gelöstsauerstoff (pO_2) sowie Restsauerstoff (O_2) und Kohlendioxidbildung (CO_2) in der Abluft
C: Nikkomycinproduktion (O_x, K_x, O_z) und Trockengewicht
D: Substratverbrauch (Phosphat, Stärke, Mannit, Gesamtstickstoff)

Abb. 6:


A
pH
7
6
5
4
B
O_2 (%)
21
20
19
18
17
pO_2 (%)
100
80
60
40
20
CO_2 (%)
5
4
3
2
1
0
C
Nikkomycin (mg/l)
K_x
O_2
O_x
500
400
300
200
100
TG (g/l)
20
16
12
8
4
D
Stärke (g/l)
Mannit
20
16
12
8
4
R_L (mM)
6
4
2
Ges. Stickstoff (g/l)
1,0
0,6
0,2
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Zeit (h)

Die Wachstumsphase ist dadurch gekennzeichnet, daß das Trokkengewicht und die CO_2-Produktion zunehmen und der pH-Wert ebenfalls ansteigt. Parallel dazu sinken der Sauerstoffpartialdruck und O_2-Gehalt in der Abluft. Die Idiophase beginnt in dem Moment, wenn Phosphat im Medium erschöpft ist. Dies ist bereits nach ungefähr 15 Stunden der Fall. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Nikkomycinproduktion und die Biomasse nimmt allmählich wieder ab. Gleichzeitig steigen der pO_2 und Sauerstoffgehalt in der Abluft wieder kurz an. Nach etwa 40 Stunden ist die Stärke im Medium verbraucht. Das bedingt ein Ansteigen des pO_2 bzw. O_2-Gehalts in der Abluft, die CO_2-Produktion nimmt ab und der Organismus beginnt, Mannit als C-Quelle zu verstoffwechseln. In dieser Phase, zwischen der 60. und 135. Stunde, bleiben das Trockengewicht, der pH-Wert, der pO_2 und die Abgaswerte relativ konstant. Der Gesamtstickstoff nimmt im Medium parallel zur Stärke ab, ist aber in keiner Phase der Fermentation limitierend.

Die Nikkomycinbildung beginnt etwa nach 17 Stunden, wobei Nikkomycin O_x bis zur 137. Stunde stetig ansteigt, während K_x und O_z nur langsam zunehmen. Nach ca. 145 Stunden ist im Kulturfiltrat kein Mannit mehr nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die Zellen zu lysieren, das Trockengewicht nimmt ab und die Nikkomycinbildung hört auf. Gleichzeitig steigen der pH-Wert und der Phosphatgehalt wieder an.

Unter diesen Bedingungen wurden 400 mg/l Nikkomycin O_x gebildet, der Gehalt an K_x und O_z lag bei 50 bzw. 100 mg/l. Daraus ergab sich für Nikkomycin O_x eine maximale Produktbildungsrate von 3,1 mg/l/h, die von K_x lag bei 0,5 mg/l/h. Verglichen mit Schüttelkulturen war die Gesamtausbeute etwa 20% niedriger.

Ein ähnlicher Prozeßverlauf ließ sich beobachten, wenn bei ansonsten identischen Bedingungen der pH-Wert konstant bei pH 5,5 gehalten wurde. Auffallend hierbei war, daß die Produk-

tion bereits nach 10 Stunden begann und nach 100 Stunden ihr Maximum erreicht hatte. Für O_x lag die Ausbeute bei 350 mg/l, der Höchstwert für K_x betrug 124 mg/l. Obwohl die Absolutausbeute für O_x niedriger ausfiel, war die maximale Produktbildungsgeschwindigkeit aufgrund der um fast 40 Stunden kürzeren Produktionszeit höher. Für O_x wurden 3,9 mg/l/h erreicht, während K_x mit 1,3 mg/l/h produziert wurde.

Die hier beschriebenen Fermentationsabläufe sind denen des Wildtyps ähnlich. Der größte Unterschied besteht darin, daß die Wachstumsphase beim Wildtyp, bedingt durch den höheren Phosphatgehalt des Hefeextraktes, verlängert ist und deshalb die Produktionsphase etwa 20 Stunden später einsetzt. Die maximale Produktbildungsgeschwindigkeit ist allerdings mit 13,7 mg/l/h Nikkomycin Z,X,I und J mehr als doppelt so hoch (KURTH, 1981).

4. Optimierung des 'resting-cell' Systems

Als 'resting-cells' werden Zellen bezeichnet, die in komplexem Produktionsmedium gewachsen sind und nach Beginn der Produktionsphase geerntet, gewaschen und in Puffer oder definiertes Medium überführt werden, in dem möglichst kein Wachstum mehr stattfinden sollte. Dieses System erlaubt es, Untersuchungen zur Antibiotika-Biosynthese und deren Regulation unter definierten Bedingungen durchzuführen (DEMAIN & KENNEL, 1978).

Ein derartiges 'resting-cell' System wurde von KURTH (1981) für den Nikkomycinproduzenten entwickelt. Das verwendete Medium bestand aus Mannit als C- und Asparagin als N-Quelle, außerdem waren Spurenelemente und ein nichtmetabolisierbarer Puffer enthalten. Die Ausbeuten, die unter diesen Bedingungen erzielt wurden, waren allerdings sehr niedrig. Um mutasynthetische Nikkomycine in diesem System überhaupt nachweisen zu

können, hatte DELZER (1983) die fünffache Biomasse eingesetzt und die Mannit- und Asparaginkonzentration erhöht. Diese Änderungen führten zu einer zehnfach höheren Nikkomycinproduktion.

Dieses System wurde für die Mutante übernommen und unter folgenden Gesichtspunkten untersucht:

1. Die Abhängigkeit der Produktion vom Alter der Vorkultur, von der eingesetzten Biomasse und vom pH-Wert im Medium zu bestimmen,
2. ein Verfahren zur Nikkomycinherstellung über Zellzurückhaltung (Immobilisierung) auf definiertem Medium zu entwickeln,
3. ein möglichst kostengünstiges, definiertes Produktionsmedium zu finden, das für diesen Zweck geeignet ist.

Die im folgenden dargestellten Parameter wurden mit und ohne L-Isoleucinzusatz im Medium, also unter stimulierenden und nicht stimulierenden Bedingungen untersucht (KURTH, 1981).

4.1. Alter der Vorkultur

Bei Organismen, die eine Trennung zwischen Tropho- und Idiophase aufweisen, sind die Enzyme des Sekundärstoffwechsels während der Wachstumsphase meist reprimiert (MARTIN & DEMAIN, 1980). Deshalb ist es wichtig, Zellen mindestens so lange zu inkubieren, bis die zur Antibiotikabildung notwendigen Enzyme induziert sind.

Bei dem in Abbildung 7 dargestellten Versuch wurden Vorkulturen unterschiedlich lang in Komplexmedium 5 angezogen. Die optimale Inkubationsdauer betrug etwa 35 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt war im Kulturfiltrat noch kein Nikkomycin nachweisbar. Es fiel auf, daß nach dieser Zeit die maximale Ausbeute im 'resting-cell' Medium mit und ohne stimulierendem Isoleucin gleich war. Der O_x-Anteil war jedoch im Ansatz mit L-

Isoleucin um 25% höher, die K_x-Menge entsprechend geringer. Mit zunehmender Inkubationszeit ging die Produktion ohne Isoleucinverfütterung deutlich stärker zurück, ebenso die spezifische Produktion.

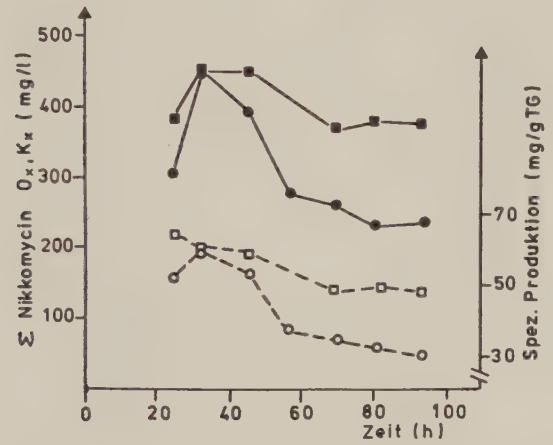


Abb. 7: Einfluß des Alters der Vorkultur auf die absolute (—■—,—●—) und spezifische (-·□·-,-·○·-) Nikkomycinproduktion in Medium 6 (—●—,-·○·-) und mit zusätzlich 30 mM L-Isoleucin (—■—,-·□·-) nach 88 Stunden

4.2. Zelldichte

Mit steigender Biomasse stieg auch die Gesamtproduktion, wobei unter diesen Bedingungen mit einer Zelldichte von 8 g/l bereits das Maximum erreicht wurde (Abb. 8). Bei Isoleucinzugabe nahm die Nikkomycin O_x-Produktion in Abhängigkeit von der Zelldichte stärker zu, die maximale spezifische Produktion war ebenfalls höher. Sie ging jedoch mit zunehmender Zellmasse in Gegenwart von L-Isoleucin stärker zurück. In Medium 6 ohne Zusatz war die K_x-Bildung deutlich höher und die

spezifische Produktion erreichte bei einer Zelldichte von 3,5 g/l ihren Höchstwert.

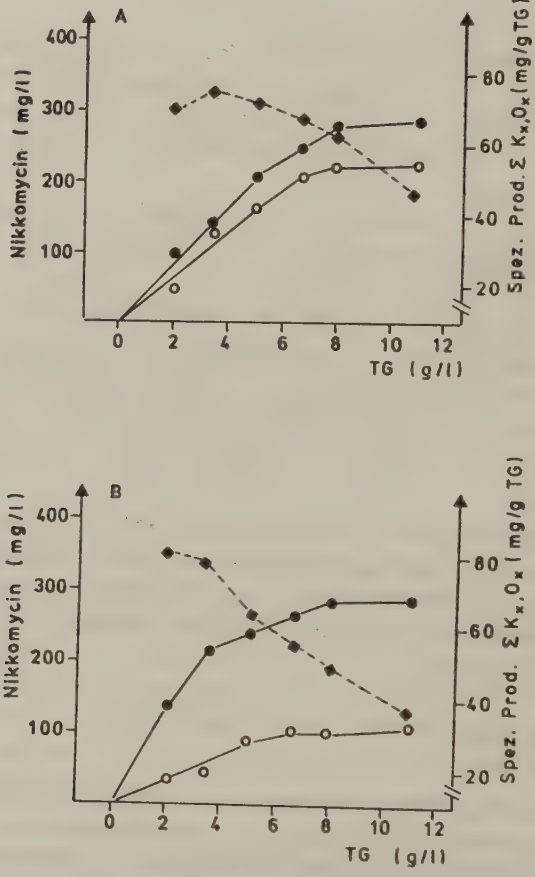


Abb. 8: Absolute (—●—,—○—) und spezifische (-◆-) Nikkomycinproduktion in Abhängigkeit von der Zelldichte in Medium 6 (A) und mit zusätzlich 30 mM Isoleucin (B) nach 67 Stunden
Nikkomycin O_x (—●—), K_x (—○—)

4.3. pH-Wert

Auf die Bedeutung des pH-Wertes für die Nikkomycine wurde bereits mehrfach hingewiesen (DEHLER, 1979; KURTH, 1981). Dies traf für die Nikkomycine O und K ebenfalls zu. In Abbildung 9 sind die Nikkomycinausbeuten bei verschiedenen Anfangs-pH-Werten dargestellt. Der für O_x optimale pH-Wert lag bei 5,5. Dagegen nahm K_x noch bis pH 6,5 stetig zu. In Gegenwart von L-Isoleucin konnte dieselbe Abhängigkeit beobachtet werden.

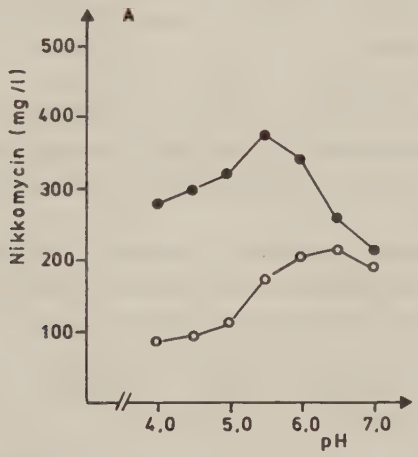


Abb. 9: Produktion der Nikkomycine O_x (—●—) und K_x (—○—) bei verschiedenen Anfangs-pH-Werten in Medium 8 nach 155 Stunden

5. Untersuchungen im definierten Medium

Die Mutante Tü 901/395/11 produzierte im 'resting-cell' Medium nach 72 h etwa 500 mg/l Nikkomycin O_x, K_x und O_z; das entsprach 70% der im Komplexmedium nach 6 Tagen erreichten Ausbeute. Medium 6 enthält mit Mannit und Asparagin zwei verhältnismäßig teure Chemikalien, die nach Möglichkeit durch

billigere Substanzen ersetzt werden sollten. Darüberhinaus sollte der Einfluß von Spurenelementen auf die Nikkomycinproduktion untersucht werden.

5.1. Kohlenstoffquelle

Bei den meisten Antibiotikaprozessen spielt die C-Quelle eine wichtige Rolle, wobei häufig zu beobachten ist, daß schnell verwertbare C-Quellen die Antibiotikabildung unterdrücken können (DEMAIN, 1982).

Glucose als schnell verwertbare Kohlenstoffquelle hatte keinen negativen Einfluß auf die Nikkomycinbildung und wurde als billigeres Substrat im Vergleich zu Mannit getestet (Tab. 4).

Tabelle 4: Nikkomycinproduktion mit verschiedenen Mannit- bzw. Glucosekonzentrationen mit 'resting-cell' Kulturen in Medium 6; Biomasse: 9,2 g/l

C-Quelle	Konz. (%)	Nikkomycin (mg/l) nach h	K_x	O_x	Produkt.raten (mg/l/h) K_x	O_x
keine	-	19	-	29	-	1,5
Mannit	2	70	177	229	2,5	3,3
	3	101	238	303	2,4	3,0
	4	123	275	342	2,2	2,8
	5	172	305	351	1,8	2,0
	6	215	300	354	1,4	1,6
Glucose	2	53	103	169	1,9	3,2
	3	70	163	253	2,3	3,6
	4	101	180	303	1,8	3,0
	5	101	187	293	1,9	2,9
	6	123	198	340	1,6	2,8
	8	200	262	445	1,3	2,2

Durch Erhöhung der C-Quelle konnten die Produktionsphase verlängert und die Ausbeuten gesteigert werden, die Produktbildungsraten gingen allerdings zurück. Bei Mannit war über 4% keine wesentliche Steigerung mehr festzustellen, während mit Glucose die Nikkomycinbildung bis 8% zunahm und insgesamt die höchste O_x-Ausbeute erzielt wurde. Bei gleichen Konzentrationen wurde mit Glucose weniger produziert, weil sie schneller verstoffwechselt und deshalb die Produktionsphase verkürzt wurde. Vergleicht man die Produktionsraten, dann konnten für O_x mit Glucose insgesamt höhere Werte erreicht werden, wobei der Maximalwert von 3,6 mg/l/h mit 3% Glucose erzielt wurde. Das Produktverhältnis von Nikkomycin O_x zu K_x war mit Glucose ebenfalls günstiger für O_x, da die relative K_x-Produktion mit Mannit höher lag. Mit der wiederholten Zugabe geringer Glucosemengen ('Glucose-feeding') konnte keine weitere Verbesserung erzielt werden.

Die Mutante produzierte mit Glucose als C-Quelle ebenfalls die bei KURTH (1981) beschriebene, gegen Bacillus subtilis auf α-Medium biologisch aktive Verbindung, bei der es sich um ein Naphthochinon handeln soll (LANGHÄRIG, 1978).

5.2. Stickstoffquelle

Die Bildung von Sekundärmetaboliten hängt wesentlich von der Qualität der eingesetzten Stickstoffquelle ab. So ist beispielsweise bekannt, daß die Antibiotikasynthese in vielen Fällen durch überschüssige Ammoniumionen unterdrückt wird (AHARONOWITZ, 1980).

L-Asparagin hat sich als geeignete N-Quelle für die Nikkomycinbildung erwiesen. Mit 'resting-cell' Kulturen des Wildtyps wurden mit 1,6 g/l die besten Resultate erzielt (DELZER, 1983). Bei der Mutante ließen sich ebenfalls mit dieser Asparaginkonzentration die höchsten Ausbeuten erreichen. Wie

aus Tabelle 5 zu entnehmen ist, ließ sich L-Asparagin durch eine anorganische Stickstoffquelle ersetzen. Dabei war Ammoniumsulfat gegenüber NH_4NO_3 und NH_4Cl (nicht dargestellt) am besten geeignet. Bei 0,5 g/l $(NH_4)_2SO_4$ lag die Ausbeute an Nikkomycin O_x mit 321 mg/l sogar deutlich über der Kontrolle mit Asparagin, bedingt durch eine um 24 Stunden verlängerte Produktionsphase. Ammoniumkonzentrationen über 1 g/l hatten auch bei doppelter Puffermenge einen starken pH-Abfall zur Folge. Dabei ging vor allem die K_x-Produktion drastisch zurück.

Tabelle 5: Nikkomycinproduktion mit verschiedenen Konzentrationen von Ammoniumnitrat und -sulfat anstelle von L-Asparagin in Medium 6 mit 100 mM MES-Puffer

N-Quelle	Konz. (g/l)	pH	Nikkomycin (mg/l) K_x	O_x
L-Asparagin	1,6	5,6	206	255
keine		5,2	192	228
NH_4NO_3	0,1	5,2	182	236
	0,5	5,4	178	269
	1	5,6	152	246
	2	4,7	50	207
	3	4,7	59	190
	5	4,3	49	169
$(NH_4)_2SO_4$	0,1	5,4	193	287
	0,25	5,3	195	308
	0,5	5,3	196	321
	0,75	5,1	194	297
	1	5,1	124	285
	2	4,1	25	161
	3	4,2	22	142
	5	4,4	24	125

Um pH-Effekte im Zusammenhang mit der Ammoniumverfütterung zu vermeiden, wurde die Mutante im Blattrührfermenter mit konstantem pH wie unter II.4.6.2.2.angegeben kultiviert (Abb. 10A). Die in Schüttelkulturen erreichten Ausbeuten konnten auf den Fermenter übertragen werden. Die Zugabe von 1 g/l Ammoniumsulfat hatte keinen Einfluß auf die Produktion. Lediglich die Biomasse stieg kurzfristig um 1,8 g/l an (Abb. 10B).

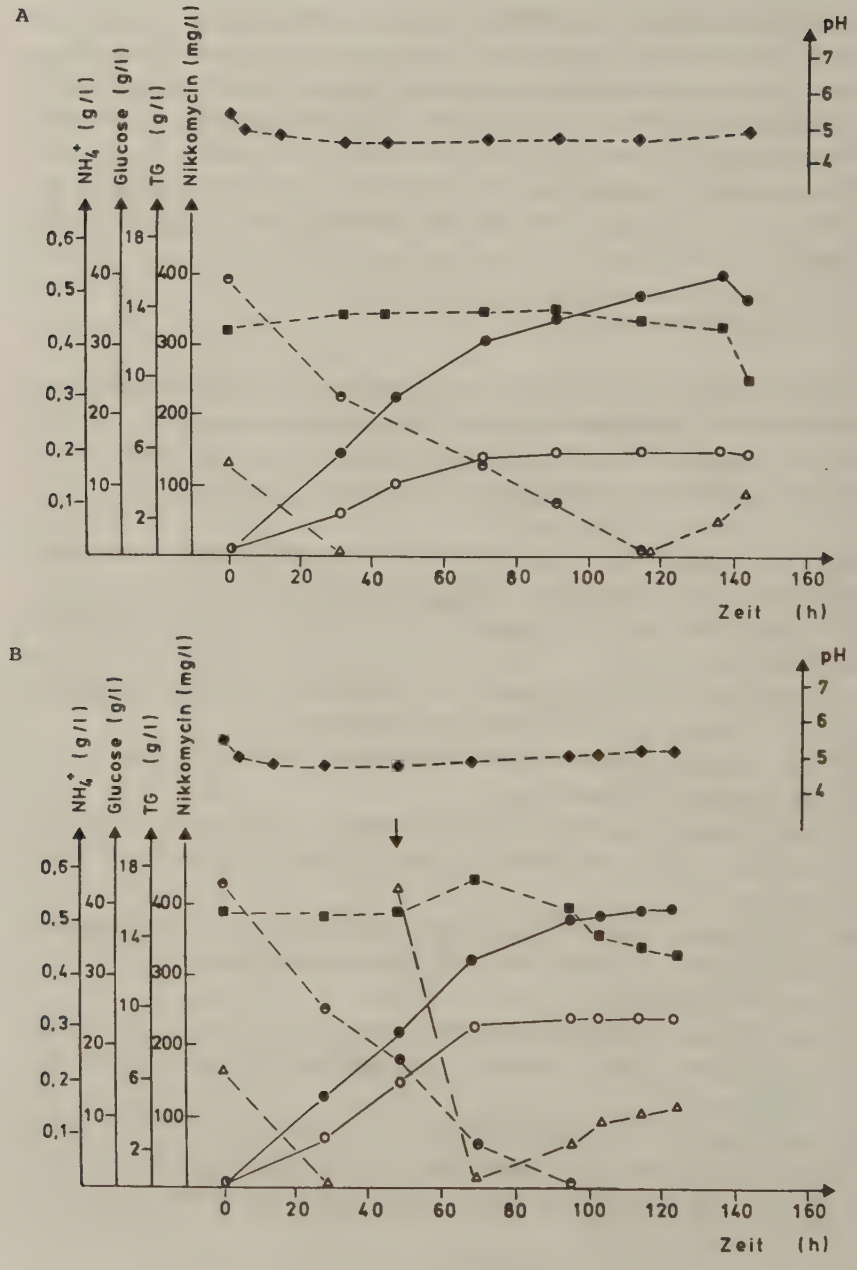
5.3. Spurenelemente

Spurenelemente sind für den Stoffwechsel aller Organismen unentbehrlich. Ihre Bedeutung im Sekundärstoffwechsel ist ebenfalls belegt, wobei hier bestimmte Elemente oft ganz spezifische Einflüße ausüben können (WEINBERG, 1982).

Welche Auswirkungen die in Medium 6 enthaltenen Spurenelemente Kupfer, Magnesium, Eisen, Zink, Calcium und Kalium auf die Synthese von Nikkomycin O und K haben, ist im folgenden aufgeführt:

1. Ohne Spurenelemente nahm die Produktion ab; von K_x wurden 20%, von O_x sogar 40% weniger gebildet.
2. Die doppelte Spurenelementekonzentration brachte keine weitere Steigerung.
3. Bei Verwendung von Leitungswasser ohne Spurenelemente wurde von K_x etwa 10% und von O_x über 40 % weniger produziert.
4. Die Zugabe von Co^{2+}, Mn^{2+} und Ni^{2+} hatte keinen Effekt.
5. Bei Zusatz von 0,9% NaCl lag die Ausbeute um etwa 30% unter der Kontrolle.
6. Nur einen geringen Einfluß hatten Zn^{2+}, Mg^{2+} und Ca^{2+}, wobei $CaCl_2$ über 300 mg/l die Produktion negativ beeinflußte.
7. Kupfersulfat und Kaliumchlorid waren erforderlich. Cu^{2+} genügte bereits in einer Konzentration von 10 mg/ml und mit KCl wurden die besten Ergebnisse mit 200 mg/l erzielt.

Abb. 10:



8. Das Verhältnis von Nikkomycin O zu K war von der Fe^{2+}-konzentration abhängig; dabei nahm mit steigender Eisenionenkonzentration der O-Anteil auf Kosten von Nikkomycin K zu (Abb.11).

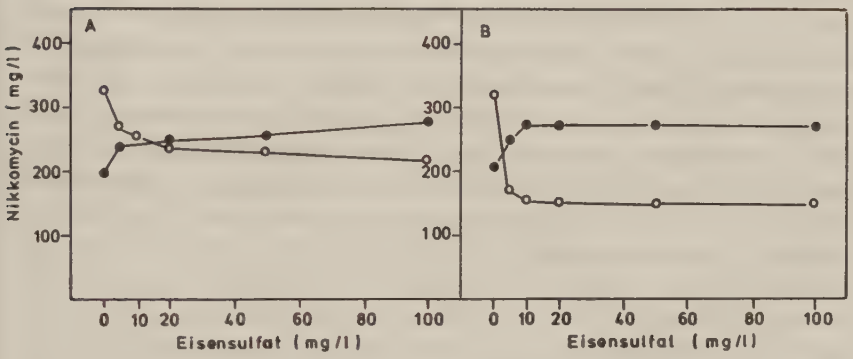


Abb. 11: Nikkomycinproduktion in Abhängigkeit von der Eisenionenkonzentration in Medium 6 (A) und mit zusätzlich 30 mM L-Isoleucin (B) nach 70 Stunden
Nikkomycin O_x (—●—), Nikkomycin K_x (—○—)

Aus den Versuchsergebnissen wurden Medium 7 und 8 zusammengestellt, die Glucose, Ammoniumsulfat, MES-Puffer und als Spurenelemente Eisensulfat, Kaliumchlorid und Kupfersulfat enthielten.

Abb. 10: Nikkomycinproduktion mit 'resting-cells' im Blattrührfermenter (Biostat S/V)
A: in Medium 8
B: in Medium 8 und Zugabe von 1 g/l $(NH_4)_2SO_4$ nach 48 Stunden (mit Pfeil markiert)
Nikkomycin O_x (—●—), Nikkomycin K_x (—○—), TG (-■-)
pH-Wert (-◆-), Glucose (-⊖-), NH_4 (-△-)

5.4. Einfluß von anorganischem Phosphat

Phosphatmangel im Medium ist häufig die Ursache für den Beginn der Antibiotikabildung. Darüberhinaus hemmen steigende Phosphatkonzentrationen in vielen Fällen ihre Synthese (MARTIN, 1977). Dieser sogenannte 'Phosphat-Effekt' wurde für die Nikkomycine des Wildtyps ebenfalls beschrieben. In Gegenwart von 50 mM P_i war deren Produktion fast vollständig unterdrückt (FIEDLER et al., 1982). Die Bildung der Nikkomycine O und K tolerierte dagegen wesentlich höhere Phosphatmengen (Abb. 12). Bis 20 mM P_i wurde die O_x-Produktion kaum beeinflußt, mit 5 mM Phosphat war sogar ein Anstieg von Nikkomycin K_x zu beobachten.

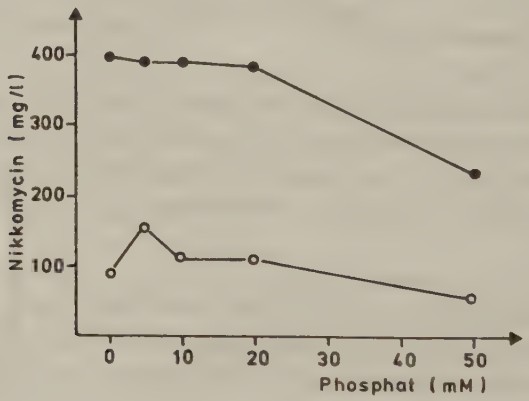


Abb. 12: Einfluß verschiedener K_2HPO_4-Konzentrationen auf die Nikkomycinproduktion in Medium 8 nach 142 Stunden
Nikkomycin O_x (—●—), Nikkomycin K_x (—○—)

5.5. Zusatz von Isoleucin

Die Nikkomycinbildung wird bei Streptomyces tendae Tü 901 durch die verzweigtkettigen Aminosäuren L-Valin, L-Leucin, D-

Isoleucin und L-Isoleucin mit zunehmender Intensität gefördert (Kurth, 1981).
Dieser stimulierende Einfluß von L-Isoleucin ließ sich auch auf die Mutante übertragen, wobei die Höhe des Effekts sehr stark von den gewählten Bedingungen abhing (Tab. 6). Die Stimulierbarkeit war um so stärker, je älter die Vorkultur war und je weniger Biomasse eingesetzt wurde (III.4.1. und III.4.2.). Für Nikkomycin K_x ließ sich so beispielsweise eine Steigerung um 425%, für O_x um etwa 240% erreichen (Tab. 6A). Wurden jüngere Vorkulturen (41 Stunden alt) eingesetzt, erhöhte sich die Ausbeute allgemein und die Stimulierung durch L-Isoleucin ging deutlich zurück. Mit Mannit als C-Quelle war nur das Produktverhältnis in Gegenwart von L-Isoleucin zugunsten von O_x verschoben. In Medium 8 konnte allgemein eine leichte Isoleucinstimulierung bis 30 mM beobachtet werden, höhere Konzentrationen beeinflußten vor allem die O_x-Synthese negativ.

5.5.1. Einfluß von Isoleucin auf das Fettsäurenmuster der Cytoplasmamembran

Beim Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin entstehen aktivierte Fettsäuren, die als Vorstufen längerkettiger Fettsäuren das Fettsäurenmuster der Cytoplasmamembran beeinflussen können. Aus Isoleucin entsteht nach Transaminierung und oxidativer Decarboxylierung 3-Methylbutyryl-CoA, das über mehrere Stufen zu Acetyl- und Propionyl-CoA abgebaut wird (LEHNINGER, 1975).

In Tabelle 7 ist der Einfluß verschiedener Isoleucinkonzentrationen auf die Fettsäurenzusammensetzung von Tü 901/8c unter 'resting-cell' Bedingungen dargestellt.

In Gegenwart von Isoleucin war der Gehalt an 12-Methyltridekansäure (iC14:0) und Isopalmitinsäure (iC16:0) reduziert,

während der Linolsäureanteil (C18:2) gestiegen war. Mit 30 mM Isoleucin verschob sich das Verhältnis von 12-Methyltetradekansäure (aC15:0) zu Isopalmitinsäure (iC16:0) von 3,3 auf 21,6.

Tabelle 6: Nikkomycinproduktion mit steigenden L-Isoleucinkonzentrationen unter verschiedenen Bedingungen
A: Medium 6, 66 h alte Vorkultur, Biomasse 6,5 g/l
B: Medium 6, 41 h alte Vorkultur, Biomasse 9,1 g/l
C: Medium 8, 41 h alte Vorkultur, Biomasse 9,1 g/l

	L-Isoleucin (mM)	Nikkomycin (mg/l)		Produktion (%)	
		K_x	O_x	K_x	O_x
A	0	35	110	100	100
	3	52	131	149	119
	10	62	200	177	182
	30	79	232	226	211
	60	116	263	331	239
	100	149	258	426	235
B	0	259	276	100	100
	3	252	303	97	110
	10	178	328	69	119
	30	145	353	56	128
	100	144	403	56	146
C	0	169	378	100	100
	3	173	434	102	115
	10	191	440	113	116
	30	215	428	127	113
	60	211	242	125	64
	100	179	151	106	40

Tabelle 7: Einfluß von Isoleucin auf die Fettsäurenzusammensetzung von 'resting-cell' Kulturen

Isoleucin (mM)	Fettsäuren (%)					
	iC14:0	C14:0	aC15:0	iC16:0	C16:0	aC17:0
0	1,4	1,8	27,6	8,4	8,7	16,2
10	0,8	0,9	26,0	5,7	8,1	18,5
30	0,1	1,0	22.7	1,1	8,8	19,2

Isoleucin (mM)	Fettsäuren (%)					
	C17:0	iC18:0	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0
0	1,4	1,8	3,7	10,1	15,1	0,4
10	1,3	2,1	3,8	10,5	18,0	1,2
30	1,8	2,1	3,7	12,9	22,2	1,4

Abkürzungen: iC14:0, 12-Methyltridekansäure; C14:0, Tetradekansäure; aC15:0, 12-Methyltetradekansäure; iC16:0, Isopalmitinsäure; C16:0, Palmitinsäure; aC17:0, 14-Methylhexadekansäure; C17:0, Heptadekansäure; iC18:0, 16-Methylheptadekansäure; C18:0, Stearinsäure; C18:1, Ölsäure; C18:2, Linolsäure; C20:0, Arachidinsäure

5.6. Tyrosinverfütterung

Bei der Suche nach weiteren Effektoren der Nikkomycinsynthese fiel L-Tyrosin auf, das in 'resting-cell' Kulturen mit einer Konzentration von 30 mM die Bildung von Nikkomycin K und O

Prof. Dr. K. Poralla danke ich für die Durchführung der Fettsäurenanalyse.

zusammen um etwa 25% steigerte (Tab. 8). Diese Stimulierung war unabhängig vom Alter der Vorkultur und vom eingesetzten Medium. Auch in Gegenwart von L-Isoleucin zeigte L-Tyrosin diesen stimulierenden Effekt.

Tabelle 8: Verfütterung von L-Tyrosin in 'resting-cell' Kulturen
A: in Medium 6 mit 75 Stunden alten Vorkulturen
B: in Medium 8 mit 40 Stunden alten Vorkulturen

	A			B		
Tyrosin	Nikkomycin (mg/l)			Nikkomycin (mg/l)		
(mM)	K_x	O_x	(%)	K_x	O_x	(%)
0	43	111	100	169	378	100
3	51	125	114	174	390	103
10	54	131	120	183	458	117
30	50	143	125	193	496	126
100	51	138	123	178	423	110

5.7. Uracilverfütterung

Uracil ist Bestandteil aller Nikkomycine der Z-Reihe. Dem Medium zugesetztes Uracil wird als Base in die Nikkomycine eingebaut und stimuliert deren Bildung in hohem Maße, wobei gleichzeitig die Synthese der imidazolhaltigen Nikkomycine unterdrückt wird (KURTH, 1981). Der gleiche Effekt war für die Nikkomycine K und O festzustellen, wie in Abbildung 13 am Beispiel von Nikkomycin O dargestellt ist. Bei Zugabe von 4 g/l Uracil in 'resting-cell' Kulturen nahm O_z um den Faktor 14 zu und die O_x-Synthese wurde mit 6 g/l fast vollständig unterdrückt. Gleichzeitig war die Produktbildungsgeschwindigkeit erhöht. Sie betrug 3,92 mg/l/h Nikkomycin O_z im Vergleich zu 3,1 mg/l/h für O_x/O_z in Medium 8 ohne Uracilverfütterung.

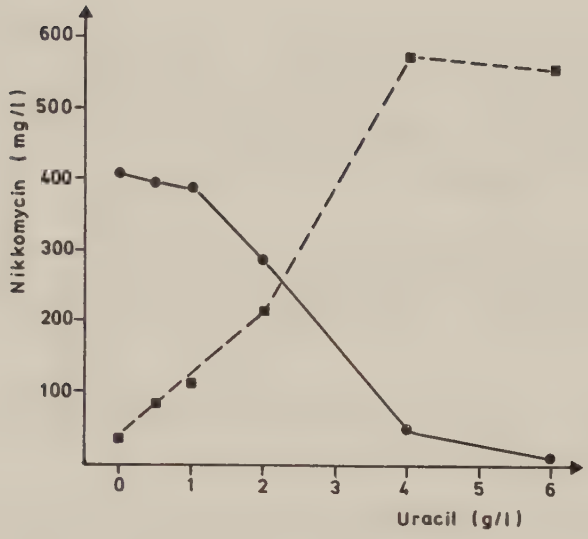


Abb. 13: Bildung von Nikkomycin O in Gegenwart von verschiedenen Uracilkonzentrationen in Medium 8 nach 148 h
Nikkomycin O_x (—●—), Nikkomycin O_z (-·■·-)

6. Nikkomycinproduktion mit immobilisierten Zellen

Die Herstellung von Nikkomycin O und K war mit 'nichtwachsenden' Zellen ('resting-cells') in einem definierten Medium möglich. Im batch-Betrieb wurden für O_x auch im neu optimierten Medium, das nur noch Glucose, Ammoniumsulfat und Spurenelemente enthielt, vergleichbare spezifische Produktionsraten (vgl. Tab. 10, III.9.) erreicht.
Interessant wird ein solches System aber erst dann, wenn es semi- oder vollkontinuierlich über längere Zeiträume mit möglichst hohen Produktionsraten betrieben werden kann. Diese Art der Prozeßführung ist nur mit Methoden der Zellzurückhaltung möglich, sei es mit Hilfe von geeigneten Membranen oder durch Immobilisierung der Zellen. Von den vielen in der

Literatur beschriebenen Verfahren ist die Immobilisierung durch Geleinschluß für empfindliche Organismen, deren volle Lebensfähigkeit für eine komplexe Produktsynthese notwendig ist, mit am besten geeignet (CHIBATA and TOSA, 1983). Als Matrix empfehlen sich natürliche Biopolymere wie Chitosane , Carrageenane oder Alginat.

Für den Nikkomycinproduzenten war der Einschluß in Ca-Alginat die beste Methode (VEELKEN and PAPE, 1982), die für die Mutante übernommen und weiterentwickelt wurde.

6.1. Vergleich der Nikkomycinproduktion mit freien und immobilisierten Zellen

In Abbildung 14 ist die Nikkomycinbildung mit freien und immobilisierten Zellen in Medium 6 dargestellt. Freie Zellen hatten nach etwa 89 Stunden die höchste Produktion mit 238 mg/l Nikkomycin O_x und 215 mg/l K_x erreicht. Mit maximaler Produktionsrate wurde allerdings nur bis zur 70. Stunde produziert, sie lag für O_x bei 3,1 mg/l/h. Nikkomycin K_x wurde maximal mit 3,5 mg/l/h produziert, wobei diese Phase um 20 Stunden später einsetzte und nur insgesamt 50 Stunden dauerte. Über 70 Stunden lag die Produktionsrate bei 2,8 mg K_x/l/h. Das Trockengewicht der eingesetzten Zellsuspension betrug 22,9 g/l.
Die Nikkomycinbildung mit immobilisierten Zellen war gering. Nach 117 Stunden wurden 47 mg/l Nikkomycin O_x und 43 mg/l K_x erreicht, entsprechend 20% der Ausbeute von freien Zellen. Gleichzeitig war die Produktion deutlich verlangsamt und nach 117 Stunden noch nicht abgeschlossen.

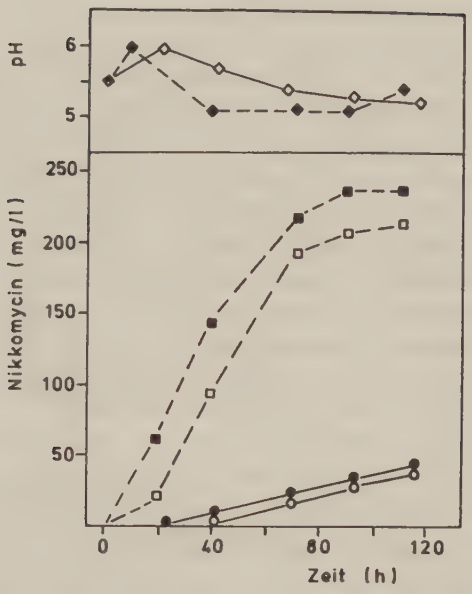


Abb. 14: Vergleich der Nikkomycinbildung von freien und immobilisierten Zellen in Medium 6. Die Größe der Gelkugeln betrug ca. 3 mm

Freie Zellen: Nikkomycin O_x (-■-), pH-Wert (-◆-)
Nikkomycin K_x (--□--),

Immob. Zellen: Nikkomycin O_x (—●—), pH-Wert (-◇--)
Nikkomycin K_x (—○—)

Um die Nikkomycinbildung von immobilisierten Zellen zu verbessern, sollte zum einen die Zelldichte erhöht und zum andern der Durchmesser der Gelkugeln verkleinert werden.
Mit höheren Zelldichten konnte die Nikkomycinausbeute nicht verbessert werden, lediglich die Produktionsphase wurde geringfügig verkürzt. Verglichen mit freien Zellen nahm die relative Produktivität sogar noch weiter ab.

6.2. Variation der Gelkugelgröße

Das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen und damit die Länge der Diffusionswege werden von der Größe der Gelkugeln bestimmt (RADOVICH, 1985). Deshalb wird die Versorgung der eingeschlossenen Zellen um so besser sein, je kürzer die Diffusionswege und damit je kleiner die Gelkugeln sind. In dem in Abbildung 15 dargestellten Versuch wurde die Nikkomycinbildung in Abhängigkeit vom Durchmesser der Gelkugeln untersucht. Dafür wurden 75 Stunden alte Vorkulturen (siehe III. 4.1.) in einer 2%-igen Natriumalginat-Lösung immobilisiert und in Medium 6 mit und ohne L-Isoleucin-Zusatz inkubiert. Die Gelkugeln mit einem mittleren Durchmesser von 0,3 mm waren im Zweiphasensystem (II.4.5.1.b) hergestellt worden, wobei allerdings die Größenverteilung, bedingt durch die Methode, verhältnismäßig stark streute. Außerdem war es unvermeidlich, daß Sojaölreste mitgeschleppt wurden.

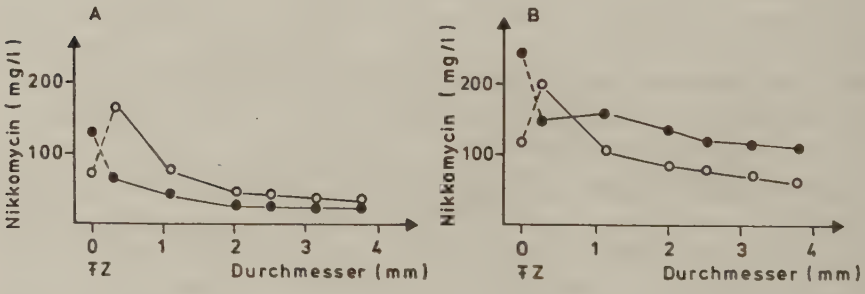


Abb. 15: Nikkomycinbildung in Abhängigkeit vom Durchmesser der Gelkugeln in Medium 6 (A) und mit zusätzlich 30 mM L-Isoleucin (B) nach 120 Stunden
Nikkomycin O_x (—●—), Nikkomycin K_x (—○—)
FZ: Freie Zellen

Wie erwartet stieg die Nikkomycinproduktion mit abnehmender

Kugelgröße an, wobei mit den kleinsten getesteten Kugeln (ca. 0,3 mm Ø) etwa 50% Nikkomycin O_x in Medium 6 bzw. 60% O_x mit zusätzlich Isoleucin im Medium erreicht wurden, jeweils bezogen auf die Ausbeute mit freien Zellen (Abb. 15). Weiterhin fiel auf, daß die K_x-Produktion in Medium 6 erstmals über der von O_x lag und daß mit den im Zweiphasensystem immobilisierten Zellen der K_x-Anteil in beiden Ansätzen überproportional hoch war. Letzteres wurde möglicherweise durch die mitgeführten Sojaölreste verursacht. Obwohl die Produktivität mit den kleinsten Gelkugeln verdoppelt werden konnte, war sie im Vergleich zu freien Zellen nach wie vor unbefriedigend, zumal auch die Herstellung und die Handhabung derart kleiner Alginatperlen relativ aufwendig war.

7. Immobilisierung von Sporen

Untersuchungen haben gezeigt, daß Zellen unter geeigneten Medienbedingungen auch innerhalb des Gels wachsen können. Sie besiedeln dabei bevorzugt die äußere Gelschicht ('immobilized cell-layer') und erreichen gleiche oder teilweise sogar höhere Zelldichten als in Submerskulturen. Dabei bleiben die Enzymaktivitäten im allgemeinen voll erhalten, die in Systemen mit homogen immobilisierten Zellen fast immer reduziert sind (WADA et al., 1979). Diese Methode eignet sich auch hervorragend zur Immobilisierung von Sporen oder Konidien. Diese 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen bilden ebenfalls eine dichte Myzelschicht an der Oberfläche der Gelkugeln (DEO et al., 1983).

In Calciumalginat immobilisierte Sporen von Streptomyces tendae Tü 901/395/11, die in Komplexmedium 5 inkubiert wurden, verhielten sich identisch. Im Schnitt durch eine Gelkugel (ca. 3 mm Ø) ist ein dichter, etwa 100 µm breiter Myzelmantel in der äußeren Gelschicht zu erkennen. Die Sporen im Inneren keimten dagegen nicht aus (Abb. 16).

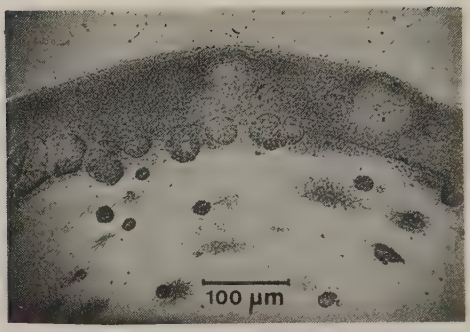


Abb. 16: Lichtmikroskopische Aufnahme von 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen in Calciumalginat

7.1. Wachstum im Gel

Das Wachstum immobilisierter Sporen wurde mit dem von freien Zellen in Schüttelkulturen verglichen (Abb. 17). Im Gel eingeschlossene Sporen zeigten gegenüber freien Sporen eine verzögerte Auskeimung und Trockengewichtszunahme, die wiederum vom eingesetzten Sporentiter abhängig waren. Bezogen auf die Gelmasse waren mit immobilisierten Sporen wesentlich höhere Biomassen zu erzielen; bei einem Sporentiter von 10^6 Sporen/ml Alginat wurden nach 77 Stunden 30,5 g/kg Gel gemessen, im Vergleich zu 22,5 g/l bei freien Zellen nach 37 Stunden. Bei verringertem Sporentiter war die lag-Phase um weitere 15 Stunden verlängert, die Biomasse stieg jedoch bis 88 Stunden auf über 32 g/kg Gel an. Zu diesem Zeitpunkt bildeten die Zellen eine feste äußere Myzelschicht, die auch nach Auflösen des Gels erhalten blieb und nur durch kräftiges Rühren zerschlagen werden konnte.

Der pH-Verlauf war tendenziell gleich; der kurze Anstieg war typisch für den Beginn der Wachstumsphase und bei den immobilisierten Sporen entsprechend verzögert. Der pH-Wert fiel

anschließend bei den 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen wesentlich stärker ab und blieb konstant auf pH 4,6 bzw. 4,7. Freie Zellen begannen nach etwa 158 Stunden zu lysieren, wobei gleichzeitig der pH-Wert anstieg. Dagegen waren bei den immobilisierten Zellen nach 213 Stunden noch keine Anzeichen einer Lyse festzustellen.

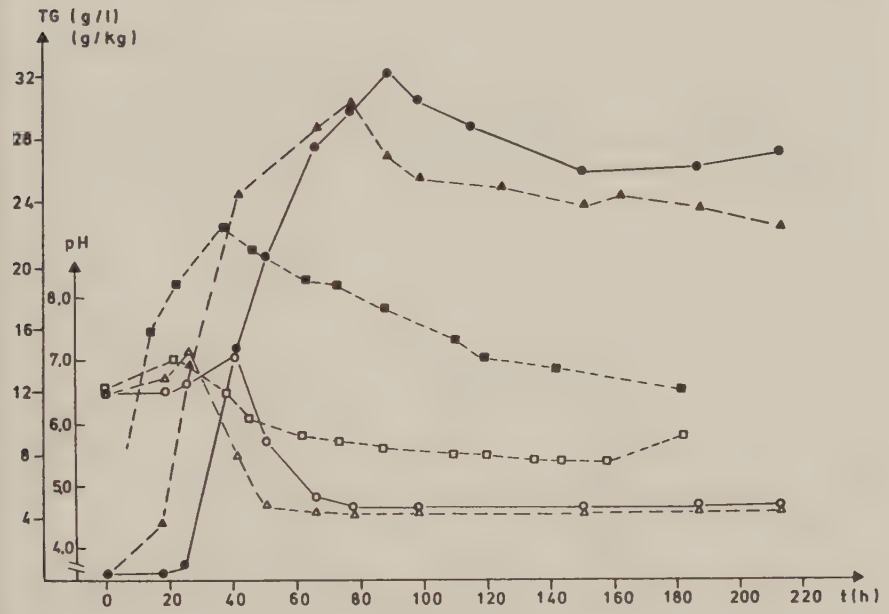


Abb. 17: Wachstums- und pH-Verlauf von freien und 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen mit verschiedenen Sporentitern in Medium 5
TG freier Zellen (-■-), pH (-□-),
TG immobilisierter Sporen:
mit 5×10^4/ml (—●—), pH (—○—),
mit 1×10^6/ml (-▲-), pH (-△-)

7.2. Optimierung der Sporenimmobilisierung

Die direkte Sporenimmobilisierung war gegenüber der Immobilisierung von Zellen in bezug auf die Nikkomycinbildung wesentlich effektiver. Mit dem unter II.4.5.2.a) beschriebenen Verfahren wurden im Medium 6 nach 98 Stunden 204 mg/l Nikkomycin O_x und 116 mg/l K_x gebildet (Abb. 18), das entspricht in der Summe ca. 70% der Ausbeute von freien Zellen. Aufgrund der um 24 Stunden verlängerten Produktionsphase waren die Produktionsraten entsprechend niedriger. Die Gesamtausbeute lag jedoch im Vergleich zu immobilisierten Zellen (III.6.1.) um den Faktor 3,7 höher, Nikkomycin O_x wurde bei vergleichbarer Zelldichte über viermal mehr gebildet.

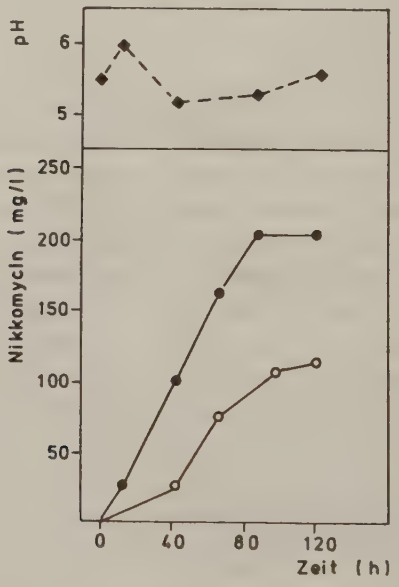


Abb. 18: Nikkomycinproduktion mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen in Medium 6
Nikkomycin O_x (—●—), Nikkomycin K_x (—○—)

Die Effizienz der Sporenimmobilisierung hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie beispielsweise von der Inkubationsdauer, vom eingesetzten Sporentiter, von der Gelgröße, von der Alginatkonzentration oder den Inkubationsbedingungen. Ihr Einfluß auf die Nikkomycinbildung wurde im folgenden untersucht.

7.2.1. Inkubationsdauer

Bei freien Zellen wurde die Nikkomycinbildung in 'resting-cell' Kulturen wesentlich von der Inkubationsdauer im Wachstumsmedium beeinflußt (siehe III.4.1.).

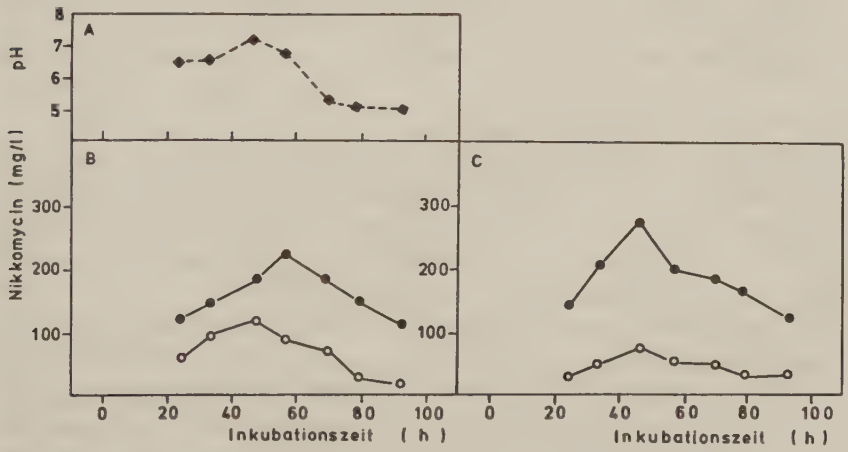


Abb. 19: Nikkomycinbildung mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer im Wachstumsmedium 5
A: pH-Werte in Medium 5 zum Zeitpunkt der Ernte
B: Nikkomycinbildung in Medium 6
C: Nikkomycinbildung in Medium 6 mit zusätzlich 30 mM L-Isoleucin
Nikkomycin O_x (—●—), Nikkomycin K_x (—○—), pH-Wert (-◆-)

Dies galt ebenso für die 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen, wobei hier die optimale Inkubationsdauer zwischen 47 und 57 Stunden lag (Abb. 19). Der Grund für die um etwa 15 Stunden gegenüber freien Zellen verlängerte Inkubationszeit lag in der längeren lag-Phase, mit der die immobilisierten Sporen auskeimten (siehe III.7.1.). Ein höherer Sporentiter (10^6 Sporen/ml) verkürzte zwar diese lag-Phase, führte jedoch zu einer geringeren Nikkomycinproduktion. Der Erntezeitpunkt ließ sich mit dem pH-Verlauf korrelieren; er war optimal, wenn der pH-Wert zu sinken begann.

7.2.2. Sporentiter

Der zur Immobilisierung eingesetzte Sporentiter beeinflußte

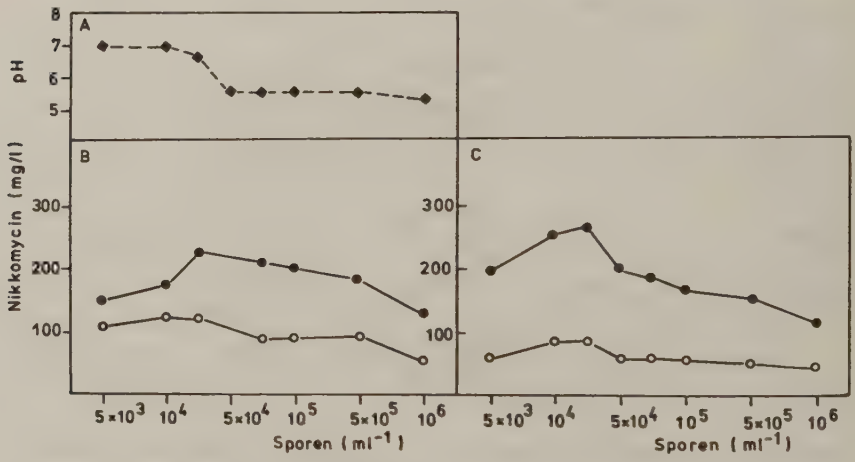


Abb. 20: Einfluß des Sporentiters auf die Nikkomycinproduktion mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen in Medium 6 (B) und mit zusätzlich 30 mM L-Isoleucin (C) nach 113 Stunden. (A): pH-Werte im Medium 5 zum Zeitpunkt der Ernte (-◆-), Nikkomycin O_x (—●—), Nikkomycin K_x (—○—)

sowohl die Länge der lag-Phase (siehe III.7.1.) als auch die Nikkomycinbildung im definierten Medium. Bei einer Inkubationsdauer von 55 Stunden wurde mit einem Titer von $2,5x10^4$ Sporen/ml Alginat die beste Ausbeute erzielt, wobei im Bereich von $2,5x10^4$ bis $5x10^5$ Sporen/ml die Unterschiede in Medium 6 relativ gering waren. In Gegenwart von L-Isoleucin war ein Optimum bei 1-$2,5x10^4$ Sporen/ml zu erkennen (Abb. 20).

7.2.3. Alginatkonzentration

Die mechanische Stabilität und die physikalischen Eigenschaften von Alginatperlen sind abhängig von der eingesetzten Alginatkonzentration (CHEETHAM, 1979; CHEETHAM et al., 1979) und beeinflussen die metabolische Aktivität der eingeschlossenen Zellen.

Mit zwei verschiedenen Alginaten konnten in Konzentrationen über 2,5% nur geringe Unterschiede bezüglich der Nikkomycinproduktion festgestellt werden (Tab. 9), wobei sich geringere Alginatmengen sowohl auf die Ausbeute als auch auf die Stabilität negativ auswirkten. Ferner wurde in Ansätzen mit 3% Alginat und mehr am Ende der Produktionsphase kein pH-Anstieg beobachtet, der immer dann auftrat, wenn Zellen lysierten. Beträchtliche Unterschiede waren jedoch in der Viskosität beider Alginate festzustellen. Laut Firmenangabe beträgt sie 500-600 mPas für eine 1%-ige Lösung des Alginats der Fa. Roth, Karlsruhe. Für Protanal LF 20/60 wurden dagegen lediglich 150 mPas gemessen, was sich bei der Verarbeitung positiv bemerkbar machte. Außerdem enthält dieses Alginat einen hohen Anteil an α-L-Guluronsäure, die für die Stabilität ausschlaggebend ist.

Tabelle 9: Einfluß verschiedener Alginate in steigender Konzentration auf die Nikkomycinbildung in Medium 6 nach 98 Stunden

Alginat	Konzentration (%)	Nikkomycin (mg/l) K_x	O_x
Alginsäure	1,5	105	177
Natriumsalz	2,0	89	164
(Roth,Karls-	2,5	112	197
ruhe)	3,0	116	204
	3,5	119	219
	4,0	95	211
Protanal	2,0	118	164
LF 20/60	2,5	127	204
	3,0	134	224
	3,5	132	230
	4,0	100	223
	5,0	104	220

7.2.4. Größe der Gelperlen

Auf die Bedeutung der Perlengröße für die Zellversorgung wurde bereits in Abschnitt III.6.2. hingewiesen.
In Abbildung 21 ist der Verlauf der Nikkomycinproduktion mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen in unterschiedlich großen Gelkugeln dargestellt. Wie erwartet war die Nikkomycinbildung um so besser, je kleiner die Gelkugeln waren. Perlen mit einem Durchmesser von 1,5 mm produzierten in 95 Stunden 456 mg/l Nikkomycin K_x und O_x, das entspricht fast der doppelten Menge, die von Gelperlen mit 4 mm Durchmesser im gleichen Zeitraum gebildet wurden. Aufgrund der längeren Produktionsphase konnte selbst mit relativ großen Kugeln noch eine beachtliche Ausbeute erzielt werden.

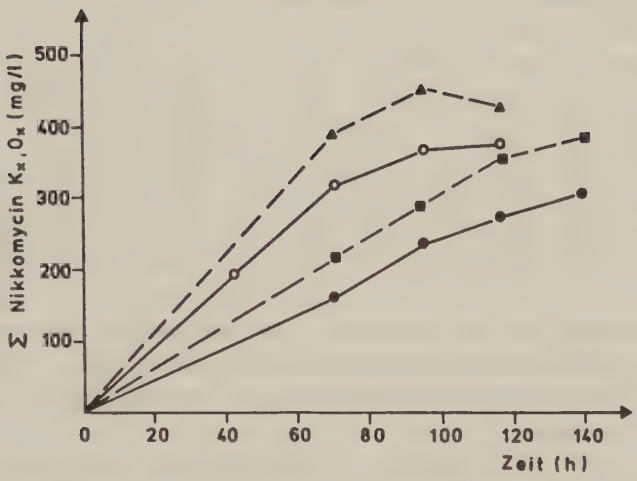


Abb. 21: Nikkomycinproduktion in Abhängigkeit vom Durchmesser der Gelkugeln in Medium 6
1,5 mm ⌀ (-▲-), 2,4 mm ⌀ (—○—),
3,1 mm ⌀ (-■-), 4,0 mm ⌀ (—●—)

7.2.5. Wachstumsbedingungen

Immobilisierte Sporen wurden unter verschiedenen Bedingungen im Komplexmedium inkubiert und nach 53 Stunden geerntet. Dabei war festzustellen, daß die Nikkomycinbildung im definierten Medium immer dann höher war, wenn die Perlen zuvor in Erlenmeyerkolben ohne seitlichen Einstich gewachsen waren, wie in Abbildung 22 am Beispiel von Nikkomycin O_x dargestellt ist. Die bei der Ernte gemessenen pH-Werte zeigten an, daß die Kulturen in Kolben mit seitlichem Einstich schneller wuchsen. Mit 100 ml Medium und doppelter Gelmenge wurde in Kolben ohne seitlichen Einstich eine gute Ausbeute erzielt. Das Medienvolumen konnte auf 50 ml weiter reduziert werden, ohne die Nikkomycinproduktion zu beeinträchtigen. In Medium 1 angezogene Zellen produzierten deutlich schlechter.

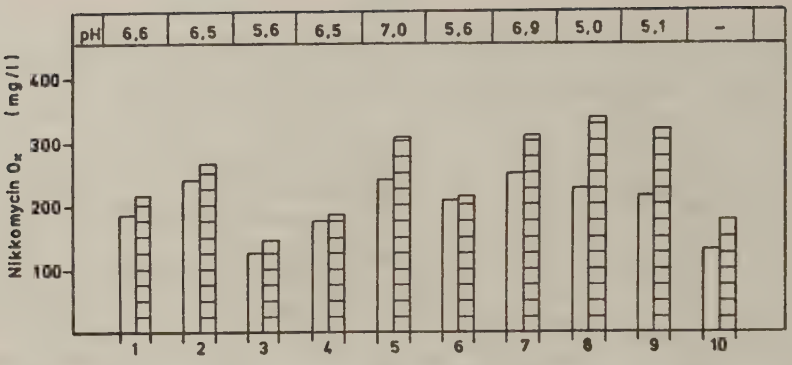


Abb. 22: Einfluß unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die Nikkomycin O_x-Produktion in Medium 6 (▭) und mit zusätzlich 30 mM L-Isoleucin (▭) nach 114 Stunden

1: 50 ml Medium 5, 500 ml-Kolben mit 1 Schikane
2: 50 ml Medium 5, 500 ml-Kolben ohne Schikane
3: 50 ml Medium 5, 500 ml-Kolben mit 4 Schikanen
4: 100 ml Medium 5, 500 ml-Kolben mit 1 Schikane
5: 100 ml Medium 5, 500 ml-Kolben ohne Schikane
6: 150 ml Medium 5, 500 ml-Kolben mit 1 Schikane
7: 150 ml Medium 5, 500 ml-Kolben ohne Schikane
8: 15 ml Medium 5, 100 ml-Kolben mit 1 Schikane
9: 15 ml Medium 5, 100 ml-Kolben ohne Schikane
10: 50 ml Medium 1, 500 ml-Kolben mit 1 Schikane

7.3. Nikkomycinproduktion mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen im definierten Medium

Die zur Optimierung der Sporenimmobilisierung durchgeführten Versuche haben gezeigt, daß sich die untersuchten Parameter gegenseitig erheblich beeinflußten und dadurch zwangsläufig immer wieder unterschiedliche Bedingungen zustandekamen. In diesem Zusammenhang hatte sich der pH-Wert zum Zeitpunkt der Ernte als wichtiger Meßwert erwiesen, der es ermöglichte,

Rückschlüsse auf den Zustand der Kultur zu ziehen. In den weiteren Versuchen, bei denen die unter II.4.5.2.b) beschriebene optimierte Sporenimmobilisierung angewendet wurde, sollte der Einfluß der eingesetzten Gelmenge und der Belüftung auf die Nikkomycinbildung untersucht werden.

7.3.1. Gelmenge

Die eingesetzte Gelmenge hatte in einem Bereich von 2,5 bis 11 g pro 15 ml Medium nur einen geringen Einfluß auf die Endausbeute. Mit steigender Gelmenge nahm die Nikkomycinproduktion zwar schneller zu, die spezifische Produktion bezogen auf die eingesetzte Gelmenge ging jedoch zurück. In batch-Kulturen wurde mit 7 g Gel pro 15 ml Medium die höchste Ausbeute mit 456 mg/l Nikkomycin O_x und K_x nach 118 Stunden erreicht. Bei semikontinuierlicher Prozeßführung war es allerdings günstiger, die höheren Produktionsraten auszunützen, die mit größeren Gelmengen (9-11 g) zu erzielen waren.

7.3.2. Belüftung

Im allgemeinen ist zwar der Sauerstoffbedarf von Zellen in der Idiophase geringer verglichen mit dem von wachsenden Zellen, bei immobilisierten Zellen jedoch, bei denen die Gelmatrix eine zusätzliche Diffusionsbarriere darstellt, ist die Sauerstoffversorgung häufig limitierend (HIEMSTRA et al., 1983).

Die Nikkomycinbildung mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen war in Schüttelkulturen abhängig von der Belüftung, wie in Abbildung 23 für Nikkomycin O_x dargestellt ist. Bei Variation der Füllmenge und der Anzahl der seitlichen Einstiche konnte die optimale Ausbeute dann erreicht werden, wenn Kolben mit mindestens einem seitlichen Einstich verwen-

det wurden, die nicht mehr als 7 g Gel pro 15 ml Medium enthielten. Mit steigender Füllmenge und geringerer Anzahl der Schikanen ging die Produktion deutlich zurück. Auffallend war, daß der stimulierende Einfluß von L-Isoleucin auf die Nikkomycin O_x-Synthese offensichtlich von der Sauerstoffversorgung abhing. Je schlechter die Belüftung war, um so stärker ging die O_x-Produktion in Gegenwart von L-Isoleucin zurück. Bei Kolben ohne Schikane und 30 ml Medium hemmte Isoleucin sogar die O_x-Synthese. Diese Beobachtung hatte sich auch bei freien Zellen bestätigt.

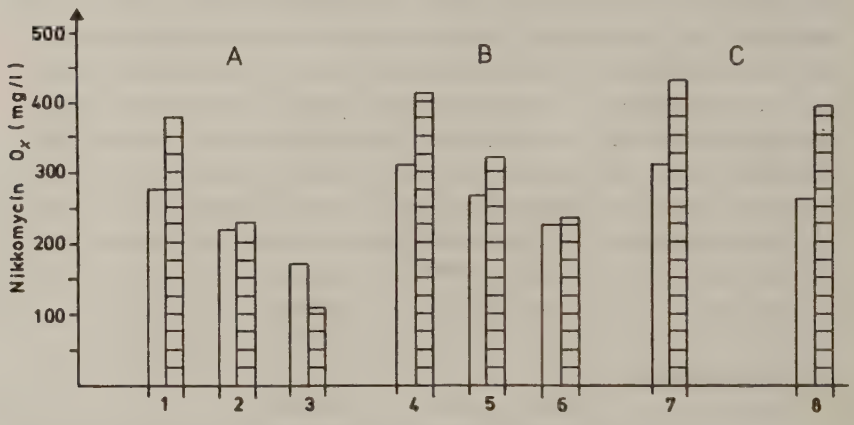


Abb. 23: Einfluß der Sauerstoffversorgung auf die Nikkomycin O_x-Produktion mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen nach 105 Stunden in Medium 6 (□) und mit zusätzlich 30 mM L-Isoleucin (▤)

A:	100 ml-Kolben, ohne Schikane	1:	15 ml	Medium,	7 g Gel
		2:	22,5 ml	Medium ,	10,5 g Gel
		3:	30 ml	Medium,	14 g Gel
B:	100 ml-Kolben, 1 Schikane	4:	15 ml	Medium,	7 g Gel
		5:	22,5 ml	Medium,	10,5 g Gel
		6:	30 ml	Medium,	14 g Gel
C:	100 ml-Kolben, 4 Schikanen	7:	15 ml	Medium,	7 g Gel
		8:	30 ml	Medium,	14 g Gel

7.3.3. batch-Fermentation mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen im Blattrührfermenter

'In situ' gewachsene immobilisierte Zellen wurden im Blattrührfermenter mit den in Abschnitt II.4.5.4. angegebenen Bedingungen fermentiert. Dieser Fermentertyp gewährleistet zum einen eine gute Sauerstoffversorgung und zum anderen sollte untersucht werden, ob die Alginatperlen der mechanischen Belastung durch Blattrührer standhalten.

Die Immobilisierung der Sporen war im Fermenter gut durchführbar und brachte folgende Ergebnisse:

Gelkugelgröße:	ca. 2 mm
Medienwechsel:	nach 66 Stunden, pH 5,5
Biomasse:	12,7 g/kg Gel
Maximale Produktion:	
Nikkomycin O_x:	352 mg/l
Nikkomycin K_x:	189 mg/l
Fermentationsdauer im definierten Medium:	122 h
Produktionsraten: O_x:	2,89 mg/l/h
K_x:	1,55 mg/l/h
Spezifische Produktionsraten O_x:	0,23 mg/g TG/h
K_x:	0,12 mg/g TG/h

Die Gesamtausbeute lag trotz größerer Gelkugeln mit 541 mg/l Nikkomycin O_x und K_x etwa 25% höher als in Schüttelkulturen. Die von den Blattrührern erzeugten Scherkräfte führten bei den Alginatperlen allerdings zu starkem Abrieb. Nach etwa 70 Stunden war zunehmend freies Myzel im Medium zu finden und am Ende der Fermentation war das Medium durch Gelabrieb und freies Myzel vollständig getrübt. Für kontinuierliche Langzeitfermentationen ist dieses Verfahren wegen der zu hohen mechanischen Belastung trotz sehr guter Ausbeuten nicht geeignet.

8. Semikontinuierliche Nikkomycinproduktion mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen

Der beträchtliche Aufwand, der mit der aktiven Immobilisierung von Mikroorganismen verbunden ist, lohnt sich nur dann, wenn ein solches Verfahren über längere Zeit mit hoher Produktivität betrieben werden kann.

In dem in Abbildung 24 dargestellten Versuch wurde das Medium nach jeweils 2 Tagen erneuert. Über etwa vier Medienwechsel konnte jeweils die Anfangsproduktion erreicht werden, nach jedem weiteren Wechsel nahm die Nikkomycinsynthese allmählich ab und betrug nach 380 Stunden und dem siebten Wechsel nur noch 35% der anfänglichen Ausbeute. Die Gesamtproduktion betrug 1906 mg/l Nikkomycin O_x und K_x, das entspricht einer spezifischen Produktion von 174,9 mg/g TG im Vergleich zu 39,4 mg/g TG im batch-Ansatz.

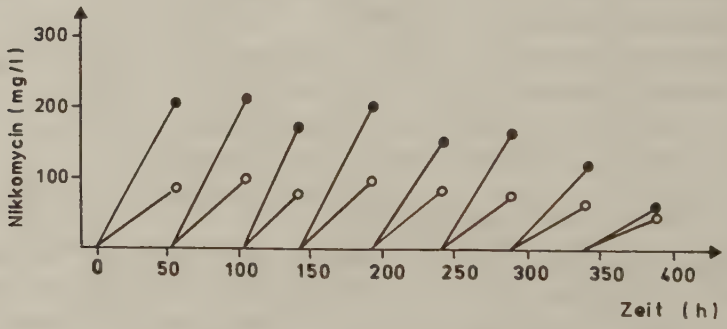


Abb. 24: Semikontinuierliche Nikkomycinproduktion mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen in Medium 6
Nikkomycin O_x (—●—), Nikkomycin K_x (—○—)

9. Vergleichende Nikkomycinproduktion

Die Nikkomycinproduktion mit freien und mit immobilisierten Zellen in verschiedenen Medien ist in Tabelle 10 zusammengefaßt. Die höchste Ausbeute wurde mit freien Zellen im komplexen Medium 5 erzielt, wobei die spezifischen Produktionsraten in Medium 6 und 7 allerdings in derselben Größenordnung lagen. Die K_x-Bildung war in Medium 6 allgemein am höchsten. In Medium 7 war die O_x-Produktion gegenüber Medium 6 nach 72 Stunden etwas höher und stieg noch bis zur 120. Stunde auf 320 mg/l weiter an, bedingt durch einen langsameren pH-Anstieg am Ende der Produktionsphase. Die K_x-Produktion war dagegen verglichen mit der in Medium 6 deutlich verringert, in dem die Produktion ihr Maximum nach etwa 72 Stunden erreicht hatte und dann wieder zurückging.

Mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen wurden wesentlich bessere Ergebnisse erzielt als mit direkt immobilisierten Zellen. Im Medienvergleich verhielten sie sich ähnlich wie freie Zellen, allerdings war die Produktionsphase in Medium 7 deutlich verlängert, was zu geringeren Produktionsraten führte und sich vor allem bei semikontinuierlicher Prozeßführung negativ bemerkbar machte.

Tabelle 10: Vergleich der Nikkomycinproduktion mit freien und mit immobilisierten Zellen in verschiedenen Medien

A: Freie Zellen im batch-Ansatz B: Immobilisierte Zellen im batch-Ansatz

C: 'In situ' gewachsene immobilisierte Zellen im batch-Ansatz und

D: in semikontinuierlicher Fermentation

	Medium	Biomasse (g/l) (g/kg)	Nikkomycinproduktion (mg/l) nach h	K_x	O_x	K_x,O_x	Prod.Rate (mg/l/h) K_x	O_x	Spez.Prod.Rate (mg/gTG/h) K_x	O_x
A	5[a]	13,5[b]	109	175	475	650	1,61	4,36	0,12	0,32
	6	9,2	74	213	232	445	2,88	3,14	0,31	0,34
	7	10,1	71	109	267	376	1,54	3,76	0,15	0,37
	8	9,1	155	169	378	547	1,09	2,44	0,12	0,27
B	6[c]	9,1	115	40	45	85	0,35	0,39	0,04	0,04
C	6	10,9	105	140	289	429	1,33	2,75	0,12	0,25
	7	10,9	121	115	262	377	0,95	2,17	0,09	0,20
D	6	10,9	309	620	1286	1906	1,59	3,31	0,15	0,30
	7[d]	10,9	389	340	889	1229	0,87	2,29	0,08	0,21

[a] 100 ml NL in 500 ml-Kolben

[b] Biomasse zum Zeitpunkt der max. Produktion

[c] Gelgröße: ca. 3 mm

[d] zusätzlich 300 mg/l $CaCl_2$ im Medium

10. Fermentation, Isolierung und Charakterisierung der neuen Nikkomycine W_x und W_z

Bei der Suche nach Überproduzenten von Tü 901/395/11 (III.2.) waren Klone aufgefallen, die im HPLC-Diagramm vor den Nikkomycinen K und O mindestens einen zusätzlichen Peak aufwiesen, der in Abbildung 25 mit der Retentionszeit von 293 Sekunden dargestellt ist. Mittlerweile sind verschiedene, für Nikkomycine typische Merkmale bekannt, die eine schnelle und relativ sichere Zuordnung von Extrapeaks ermöglichen. Diese Merkmale trafen für die unbekannten Substanzen zu:

1. Nikkomycine, die sich jeweils nur in der Base unterscheiden, treten im allgemeinen im HPLC-Diagramm als Doppelpeak auf.
2. Mit Uracil ließ sich der Doppelpeak verschieben, wobei der Peak mit der längeren Retentionszeit unterdrückt wurde.

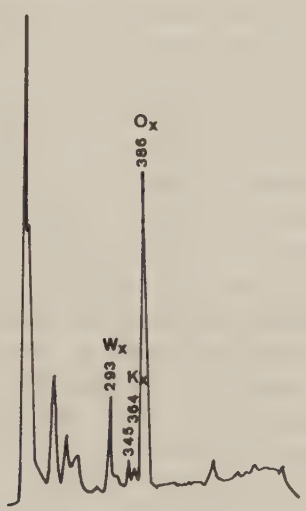


Abb. 25: HPLC-Diagramm aus dem Kulturfiltrat einer Schüttelkultur mit der Mutante Tü 901/395/11/32 in Medium 5

3. Bei Zugabe von Barbitursäure (DELZER, 1983) verschwand selektiv der Peak mit der längeren Retentionszeit (Hinweis auf eine Imidazolbase).
4. Die Substanzen banden quantitativ an Dowex 50 WX 4 (Kationenaustauscher) und verhielten sich auch bei der Isolierung wie Nikkomycine.
5. Die mit Photo-Dioden-Array-Detektion aufgenommenen UV-Spektren wiesen die für Nikkomycine typischen UV-Maxima bei 260 bzw. 290 nm auf (Abb. 27).

10.1. Fermentation und Isolierung

Die Produktion beider Substanzen war in Schüttelkulturen sehr unregelmäßig und mit den über die Mutante gewonnenen Daten im Fermenter nicht möglich. Die in Schüttelkulturen erreichten Ausbeuten lagen bestenfalls bei insgesamt etwa 200 mg/l. Die Isolierung erfolgte wie bei DELZER (1983) beschrieben. Beide Substanzen wurden an SP-Sephadex C 25 vor den Nikkomycinen K und O eluiert, konnten aber über Biogel P 2 nicht voneinander getrennt werden.

10.2. Charakterisierung

10.2.1. Strukturformeln

Die von Prof. Dr. W.A. König, Hamburg, durchgeführte Strukturaufklärung erbrachte den Beweis, daß es sich um neue Nikkomycine handelt (Abb. 26). Bei den mit Nikkomycin W_x und W_z bezeichneten Verbindungen besteht die aliphatische Seitenkette aus der Aminosäure L-Tyrosin.

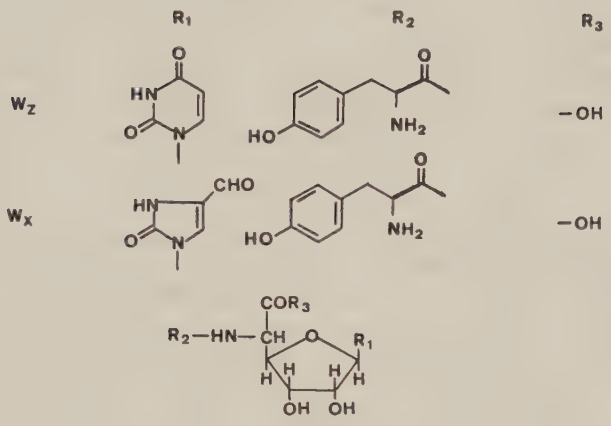


Abb. 26: Strukturformeln von Nikkomycin W_X und W_Z

10.2.2. Physikalische Daten

10.2.2.1. UV-Spektren

In Abbildung 27 sind die UV-Spektren von Nikkomycin W_X und W_Z im Vergleich zu O_X und O_Z dargestellt. Die Nikkomycine mit der Imidazolbase (W_X, O_X) zeigen ein Maximum bei 290 nm, ein UV-Maximum von 260 nm ist charakteristisch für die Nikkomycine mit Uracil als Base (W_Z, O_Z). Die Schulter bei 225 nm ist kennzeichnend für die Aminosäure mit der Hydroxyphenylgruppe; sie tritt bei Nikkomycin B ebenfalls auf.

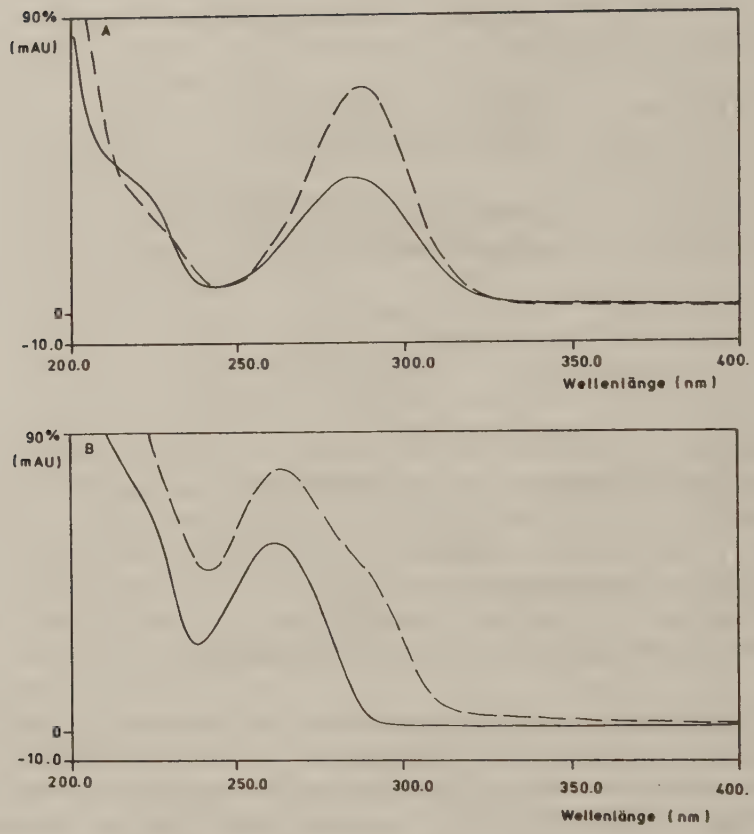


Abb. 27: A: UV-Spektren von Nikkomycin W_X (——) und O_X (- - -)
B: UV-Spektren von Nikkomycin W_Z (——) und O_Z (- - -)

10.2.2.2. pH-Stabilität

Für Nikkomycin B_X/B wurde gegenüber den anderen Nikkomycinen eine wesentlich höhere Hydrolysestabilität festgestellt (RATHMANN, 1984). Die pH-Stabilität von Nikkomycin W_X/W_Z war ebenfalls höher (Abb. 28). Bei pH 5,5 war nach 14 Tagen noch

100% der eingesetzten Menge nachzuweisen, bei pH 7,0 und 8,0 lag der Verlust im selben Zeitraum nur bei 10%. Der Zerfall von Nikkomycin X und O_X fiel dagegen wesentlich drastischer aus, wobei beispielsweise von X nach 14 Tagen bei pH 8,0 nur noch 10%, von O_X 42% nachzuweisen waren.

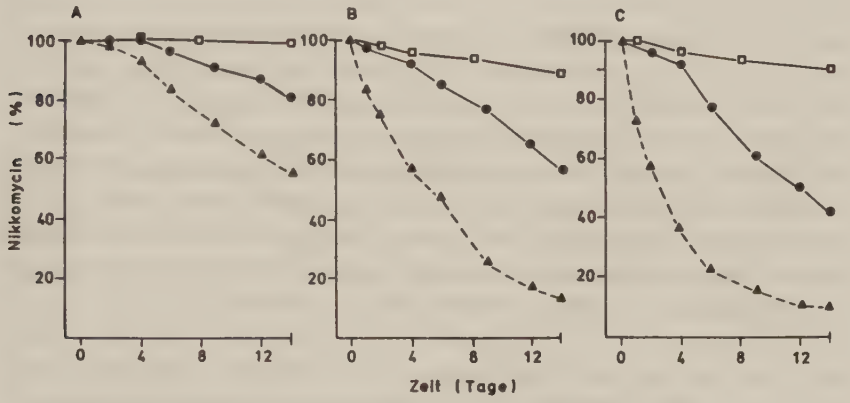


Abb. 28: pH-Stabilität der Nikkomycine X (-▲-), O_X (—●—) und W_X (—□—) in 50 mM Puffer
A: MES pH 5,5 B: MOPS pH 7,0 C: Tricin pH 8,0

10.2.3. Biologische Aktivität

Ein Gemisch von Nikkomycin W_X/W_Z (1:1) war gegen alle unter II.3.2. aufgeführten Pilze selbst in Konzentrationen bis 1 g/l biologisch nicht aktiv. Nikkomycin X und O_X, die parallel mitgetestet wurden, zeigten die erwartete Hemmwirkung (BORMANN et al., 1985).

IV. DISKUSSION

1. Fermentation

Bei der Suche nach modifizierten Strukturen bereits bekannter Antibiotika sind bisher zwei der dafür in Frage kommenden Methoden bei den Nikkomycinen erfolgreich angewendet worden. Zum einen konnten über Mutasynthese und gerichtete Fermentation neue, auf der Basenseite veränderte Nikkomycine erhalten werden (DELZER, 1983) und zum anderen wurden Mutanten isoliert, die Nikkomycine mit modifizierten Seitenketten oder mit einem anderen Substituenten an der freien Carboxylgruppe des Nucleosids bilden (BORMANN et al., 1985).

Die Mutante mit der Bezeichnung Tü 901/395/11 produziert nur noch die Nikkomycine K und O. Beide Verbindungen werden in geringen Mengen auch vom Wildtyp gebildet, fielen aber erst auf, als DELZER (1983) für die gerichtete Fermentation ein basenarmes Medium entwickelte und auf den Hefeextrakt verzichtete. Die Variation des Hefeextraktanteils im Medium ergab, daß Konzentrationen über 0,5% die Bildung von Nikkomycin K und O bereits hemmen, wohingegen beim Wildtyp die Z/X-Synthese unter pH-statischen Bedingungen noch bis 2% Hefeextrakt gefördert wurde (DEHLER, 1979).

Hefeextrakt besteht aus Kohlenhydraten, Basen, Spurenelementen, Vitaminen und Aminosäuren (BRIDSON & BRECKER, 1970). Da Aminosäuren an der Regulation der Nikkomycinsynthese beteiligt sind (KURTH, 1981), seitens des Herstellers jedoch keine exakten Angaben über die Zusammensetzung des Hefeextraktes existieren, wurde eine Aminosäurenanalyse durchgeführt. Die anschließenden Verfütterungsexperimente brachten allerdings keine eindeutigen Ergebnisse. Die Kenntnis dieses 'Hemmstof-

fes' im Hefeextrakt wäre interessant und ließe wahrscheinlich Rückschlüsse auf die Biogenese der verzweigtkettigen Aminosäure im Nikkomycin zu.

Weiterhin fiel bei der Mutante eine ungewöhnlich hohe Nikkomycin C-Produktion auf. In Komplexmedium lag sie im allgemeinen bei etwa 1 g/l und damit etwa um das Dreifache höher als beim Wildstamm. Dies deutet auf eine gestörte Synthese der Aminosäure-Seitenkette hin.

Die aktiven Nikkomycine K_x, O_x und O_z wurden im Fermenter in einer Konzentration von 550 mg/l gebildet. Diese Ausbeute ließe sich sicher über eine feeding-Fermentation noch steigern (ZÄHNER & KURTH, 1982), wobei allerdings der CO_2- oder O_2-Gehalt in der Abluft dem pO_2 als Regelgröße vorzuziehen wäre, da diese Meßwerte wesentlich zuverlässiger zu erfassen sind.

'resting-cell' Systeme haben sich bei Untersuchungen zur Biogenese und Regulation von Sekundärmetaboliten bewährt. Darüberhinaus kann diese Form der Zellkultivierung zur semi- oder vollkontinuierlichen Produktion von Metaboliten im definierten Medium weiterentwickelt werden, wobei die 'nichtwachsenden' Zellen im Fermenter zurückgehalten werden müssen. Für diesen Zweck eignen sich sterilisierbare Membranen oder Filtermodule, die im Querstromverfahren wie bei der Ultrafiltration betrieben werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Zellen zu immobilisieren. Die Produktivität von 'resting-cell' Kulturen hängt von verschiedenen Faktoren ab, so z.B. vom Alter der Zellen oder von der eingesetzten Zelldichte.

Bei der ß-Lactam-Biosynthese sowohl bei Cephalosporium (DEMAIN & KENNEL, 1978; BEHMER & DEMAIN, 1983) als auch bei Streptomyces clavuligerus (HU et al., 1984) hat sich gezeigt, daß mit Zellen aus der frühen exponentiellen Phase höhere Produktionsraten erzielt wurden als mit älteren.

Dieselbe Beobachtung konnte bei der Mutante von Streptomyces tendae gemacht werden, bei der mit Zellen, die nach etwa 35 Stunden geerntet wurden, die höchste Produktion unter 'resting-cell' Bedingungen zu erzielen war. Vermutlich ist die Enzymaktivität zu diesem Zeitpunkt am höchsten und wird mit zunehmendem Zellalter wieder geringer. Für die Isopenicillin N-Synthetase konnte dieser zeitliche Verlauf nachgewiesen werden (HEIM et al., 1984).

Auch mit zunehmender Zelldichte stieg die Nikkomycin-Ausbeute an, wobei bereits mit 8 g TG/l der Höchstwert erreicht wurde. Gleichzeitig sank die spezifische Produktion. Dieser negative Effekt wird durch eine schlechter werdende Substratversorgung und Belüftung bei steigender Zelldichte verursacht. Eine verbesserte Belüftung würde diesen Effekt zumindest teilweise aufheben (BRANA et al., 1983).

In der Literatur sind viele Beispiele beschrieben, in denen schnell verwertbare Kohlenstoffquellen, wie etwa Glucose, die Bildung von Sekundärmetaboliten hemmen (DEMAIN, 1982). Diese C-Katabolit-Regulation kann zur Repression an der Synthese beteiligter Enzyme führen. Für die Cephalosporin C-Bildung konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die Cephalosporin C-Synthase (Expandase) sowohl bei Cephalosporium acremonium (BEHMER & DEMAIN, 1983; HEIM et al., 1984) als auch bei Penicillium chrysogenum (ZANCA & MARTIN, 1983; REVILLA et al., 1984) durch Glucose reprimiert wird. Andere Enzyme wurden dagegen kaum beeinflußt.

Für die Nikkomycinbildung war Glucose als C-Quelle gut geeignet und wies selbst in Konzentrationen von 60 g/l keinen hemmenden Effekt auf. Steigende Kohlenstoffmengen führten über eine verlängerte Produktionsphase zu höheren Ausbeuten, wobei allerdings die Produktionsraten , über die gesamte Zeit betrachtet, abnahmen. Vermutlich werden bei verlängerter Idiophase zunehmend andere Substrate limitierend. Im Vergleich zu

Mannit wird Glucose schneller verbraucht und ist deshalb in höherer Konzentration erforderlich, um die gleiche Ausbeute zu erreichen. Mit Glucose sind jedoch die Produktionsraten für Nikkomycin O_x höher. Beim Mannitabbau ist möglicherweise die geringe Aktivität der Mannit-Dehydrogenase der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (VEELKEN, 1983). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, daß Mannitkonzentrationen über 4% keinen Einfluß mehr auf die Nikkomycinproduktion hatten.

Bei den Nikkomycinen handelt es sich um stickstoffreiche Verbindungen, die sich zum Teil von Aminosäuren ableiten und deren Biosynthese damit letztlich auch von der Stickstoffregulation beeinflußt wird. Es ist bekannt, daß hohe Ammoniumionen-Konzentrationen auf die Antibiotikabildung oft hemmend wirken (GRÄFE, 1982). In vielen Fällen konnte die Hemmung durch Zusatz von Magnesiumphosphat oder Zeolit wieder aufgehoben werden (OMURA & TANAKA, 1984).
Das zur Nikkomycinproduktion verwendete definierte Medium enthält L-Asparagin, eine häufig eingesetzte N-Quelle (INOUE et al., 1982; SHEN et al., 1984). Asparagin konnte bereits durch 0,5 g/l Ammoniumsulfat ersetzt werden, wobei höhere Ammoniumkonzentrationen zu einer starken Ansäuerung des Mediums führten. Pyruvat, das von einigen Antibiotikaproduzenten ausgeschieden wird (NAGATO et al., 1984), konnte bei Streptomyces tendae allerdings nicht nachgewiesen werden (SOMMER, 1983). Die Zufütterung von 7,5 mM $(NH_4)_2SO_4$ während der Produktionsphase hatte keinen Einfluß auf die Nikkomycinsynthese, wenn der pH-Wert konstant gehalten wurde. Für die Cephamycinbildung bei Streptomyces lactamdurans ist beschrieben, daß bereits 1 mM Ammonium hemmend wirkten, wobei die Glutamin-Synthetase-Aktivität und der Gehalt an Syntheseenzymen und Vorstufen reduziert waren (CASTRO et al., 1985).

Die Nikkomycinbildung war auch ohne Stickstoff im Medium relativ hoch. Wenn man berücksichtigt, daß pro Mol Nikkomycin mindestens 5 Mol Stickstoff benötigt werden, muß die Zelle

über entsprechende Stickstoffreserven verfügen. Diese Funktion könnte Glutaminsäure übernehmen, deren Konzentration während des Wachstums stark ansteigt und in der Produktionsphase wieder zurückgeht (KURTH, 1981).

Phosphat fördert allgemein das Wachstum und unterdrückt in vielen Fällen die Antibiotikabildung (MARTIN, 1977), wobei bestimmte Enzyme sowohl reprimiert als auch inhibiert werden können (LÜBBE et al., 1985).
Die Nikkomycinproduktion wurde bei der Mutante in 'resting-cell' Kulturen durch anorganisches Phosphat wesentlich weniger beeinflußt als dies für den Wildtyp beschrieben ist (FIEDLER et al., 1982). In Gegenwart von bis zu 20 mM P_i war keine Hemmung der Nikkomycin K- und O-Synthese zu beobachten, dagegen wird die Synthese von Z und X beim Wildstamm bei gleicher Phosphatkonzentration fast vollständig unterdrückt. Die Produktion beginnt bei beiden Stämmen nachweislich erst dann, wenn P_i im Medium erschöpft ist. Dies könnte bedeuten, daß die Enzyme durch Phosphat reprimiert und unter 'resting-cell' Bedingungen unterschiedlich stark inhibiert werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde für Streptomyces clavuligerus beschrieben, bei dem die Clavulansäurebildung im Vergleich zur Cephamycinproduktion ebenfalls wesentlich sensitiver gegenüber Phosphat ist (ROMERO et al., 1984).

Spurenelemente sind essentiell für den Primär- und Sekundärstoffwechsel. Im Sekundärmetabolismus spielen oft bestimmte Elemente wie Zink, Mangan oder Eisen eine besondere Rolle und werden teilweise in wesentlich höheren Konzentrationen benötigt (WEINBERG, 1977).
Untersuchungen zur Abhängigkeit der Nikkomycinsynthese von bestimmten Spurenelementen haben gezeigt, daß der relative Anteil der Nikkomycine K und O eisenabhängig ist. Unter Eisenmangel wurde mehr Nikkomycin K auf Kosten von O gebildet. Beide Verbindungen unterscheiden sich strukturell lediglich in der Hydroxylgruppe am Pyridylring.

Eisen ist häufig Bestandteil von Oxygenasen und direkt an der Katalyse von Hydroxylierungsreaktionen beteiligt, wobei molekularer Sauerstoff in das Substrat eingeführt wird. Monooxygenasen katalysieren die einfache Hydroxylierung von Verbindungen, während das zweite Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird. Als Wasserstoffdonatoren fungieren meist reduziertes $NADPH_2$ bzw. $NADH_2$ oder Flavine (LEHNINGER, 1975). Bei diesen Pyridinnucleotid-abhängigen Monooxygenasen handelt es sich häufig um Multienzymkomplexe, die aus der eigentlichen Oxygenase und zusätzlichen Redoxkomponenten wie Flavin- und Nicht-Häm-Eisenproteiden bestehen. Sie sind oft membrangebunden und nicht immer spezifisch. Am besten untersucht sind die Cytochrom-P-450-abhängigen Monooxygenasen, die als sauerstoffaktivierende Komponente eisenhaltige Porphyrinkomplexe besitzen. Die Campher-5-Monooxygenase aus Pseudomonas putida, die den ersten hydroxylierenden Schritt beim Abbau des Camphers durchführt, besteht beispielsweise aus einer 11-ß-Monooxygenase, aus einem Flavoprotein, einem Nicht-Häm-Proteid und Cytochrom P 450 (ULLRICH, 1972).

Die Frage, ob Nikkomycin K die direkte Vorstufe von O ist bzw. in welcher Biosynthesestufe die Hydroxylierung erfolgt, läßt sich derzeit noch nicht beantworten. Interessant ist jedoch die Beobachtung, daß bei Verfütterung von Nikkomycin K_x an den Wildtyp im HPLC-Diagramm an der Stelle ein Peak erscheint, an der sonst O_x eluiert wird und dieser Peak ein für Nikkomycine der X-Reihe typisches UV-Spektrum aufweist (BORMANN, persönliche Mitteilung, 1985). Die relativ geringen Transformationsraten könnten einmal damit erklärt werden, daß Nikkomycin K_x schlecht transportiert wird, denn SOMMER (1983) konnte zeigen, daß Hydroxypyridylhomothreonin nicht aufgenommen wird. Zum anderen könnte Nikkomycin K ein Substrat mit nur geringer Affinität zur Monooxygenase darstellen, denn in Analogie zur Polyoxin-Biosynthese (ISONO & SUZUKI, 1979) müßte die Hydroxylierung erfolgen, bevor die Peptidbindung geknüpft wird.

Die Monooxygenase der Mutante scheint eine geringere Aktivität zu besitzen, da im Gegensatz zum Wildstamm die nichthydroxylierte Verbindung in beträchtlicher Menge im Medium nachweisbar war und mit steigendem pH-Wert dieser Anteil noch zunahm. Möglicherweise liegt das pH-Optimum dieses Enzyms im Sauren.

Die Nikkomycinsynthese läßt sich durch verzweigtkettige Aminosäuren, vor allem durch Isoleucin, stimulieren. Isoleucin, Leucin und Valin werden allerdings nicht als potentielle Vorstufen ins Nikkomycin eingebaut (KURTH, 1981; SOMMER, 1983). Als Mechanismus wurde ein Regulationseffekt diskutiert, nach dem diese Aminosäuren die Threonin-Dehydratase hemmen und damit eine Anhäufung von L-Threonin entsteht, das als mögliche Vorstufe in die Synthese der verzweigtkettigen Aminosäure-Seitenkette abfließt (KURTH, 1981). Der direkte Threonineinbau konnte allerdings bis jetzt weder bestätigt noch vollständig ausgeschlossen werden (SOMMER, 1983). Gegen diese Hypothese spricht die Tatsache, daß die Verfütterung von Threonin keinen positiven Effekt zeigte, obwohl es gut aufgenommen wird.
Isoleucin beeinflußte ebenfalls die Bildung von Nikkomycin K und O, wobei dieser Effekt wesentlich von den Kulturbedingungen abhängig war. Dabei wurden folgende Beobachtungen gemacht:

1. Die Stimulierbarkeit der Produktion durch Isoleucin hing vom Alter der Zellen ab. Zellen, die länger im Komplexmedium inkubiert wurden, ließen sich als 'resting-cell' Kulturen stärker stimulieren (Abb. 7, Tab. 6).
2. Unter Sauerstoffmangel ging die Produktion von Nikkomycin K und O in Gegenwart von Isoleucin deutlich stärker zurück. Unter bestimmten Bedingungen wirkte Isoleucin sogar reprimierend (Abb. 23).
3. Der Isoleucineffekt war bis zu einem gewissen Grade vom Medium abhängig (Tab. 6).
4. In Gegenwart von Isoleucin wurde signifikant mehr C-Quelle

verbraucht (VEELKEN & PAPE, 1984).

5. Isoleucin veränderte beim Wildstamm das Fettsäurenmuster der Cytoplasmamembran. Die mit Prof. Dr. K. Poralla und Dr. R. Kurth durchgeführte Fettsäurenanalyse ergab eine deutliche Verschiebung des Verhältnisses von 12-Methyltetradekansäure (aC15:0) zu Isopalmitinsäure (iC16:0) um etwa Faktor 7 (III.5.5.1.).

Diese Änderung des Fettsäurenmusters bei Isoleucinsupplementierung wurde für Streptomyces hygroscopicus und Streptomyces griseus in derselben Weise beschrieben (GRÄFE et al., 1982a). Offenbar ist die Fettsäurenzusammensetzung auch medien- und altersabhängig und mit zentralen Stoffwechselabläufen korreliert. Streptomycin- und Luftmyzel-Minus-Mutanten von Streptomyces griseus zeigen beispielsweise ein erhöhtes Verhältnis von aC15:0- zu iC16:0- Fettsäuren, wie es auch bei Isoleucinverfütterung entsteht (GRÄFE et al., 1982b). Darüberhinaus sind Beispiele beschrieben, bei denen die Produktion von Exoenzymen (RAMALEY, 1979) und Antibiotika (ARIMA et al., 1973; OKAZAKI et al., 1974) durch Änderungen im zellulären Fettsäurenspektrum induziert wurden.
Die Beobachtungen, daß in Gegenwart von Isoleucin mehr C-Quelle verbraucht wird bzw. unter Sauerstoffmangel die Nikkomycinsynthese stärker negativ beeinflußt wird, deuten ebenfalls mehr auf einen allgemeinen Stoffwechseleffekt hin.

Beim Nikkomycinproduzenten wäre zu untersuchen, ob die vom Alter der Zellen abhängige Isoleucinstimulierbarkeit eventuell mit der altersabhängigen Änderung des Fettsäurenmusters korreliert ist bzw. unter Sauerstoffmangel ebenfalls das Fettsäurenspektrum beeinflußt wird. Neue Aspekte ergeben sich möglicherweise auch dann, wenn die Biogenese der Aminosäure-Seitenkette aufgeklärt ist.

Im Gegensatz zum Isoleucineffekt war die geringe Stimulierung durch L-Tyrosin unabhängig von den Kulturbedingungen. Beim

Tyrosinabbau entstehen mit Fumarat und Acetoacetat zwei mit dem Citratzyklus verbundene C_4-Verbindungen (LEHNINGER, 1975), die als Bausteine für die Aminosäure-Seitenkette diskutiert werden (PAPE, persönliche Mitteilung, 1985).

2. Immobilisierung

Verfahren mit immobilisierten Zellen haben gegenüber konventionellen Fermentationsverfahren im allgemeinen folgende Vorteile (KENNEDY & CABRAL, 1983):

1. Mit verschiedenen Immobilisierungsmethoden ist es möglich, Zellen mit hoher Dichte im Reaktor zurückzuhalten, wodurch auch Prozesse mit 'nichtwachsenden' Zellen kontinuierlich geführt und die Zellen als Biokatalysatoren wiederverwendet werden können.
2. Bei Verfahren, in denen das Zellwachstum und die Produktbildung zeitlich getrennt sind, lassen sich jeweils die für die Tropho- und Idiophase optimalen Bedingungen einsetzen, wobei es häufig möglich ist, in der Produktionsphase definierte Medien zu verwenden, die die Produktisolierung erleichtern können.

Immobilisierte Zellen weisen jedoch meistens eine geringere Produktivität auf, die, abhängig von der Methode, durch Diffusionsbarrieren und/oder Zellinaktivierung während der Immobilisierung verursacht wird (KLEIN & WAGNER, 1983).
Derzeit wird in erster Linie an Verfahren zur Herstellung von Ethanol, Aminosäuren, verschiedenen organischen Säuren und zur Biotransformation von Steroiden mit immobilisierten Zellen gearbeitet (LINKO & LINKO, 1983; MAZUMDER et al., 1985).
Die Mutante Tü 901/395/11 wurde mit der gebräuchlichsten Methode, durch Einschluß in Ca-Alginat immobilisiert. Mit so fixierten Zellen des Wildtyps konnte eine relative Produktivität von 60% erreicht werden (VEELKEN, 1983). Die unter ähnlichen Bedingungen mit der Mutante erzielten Werte lagen mit

20% wesentlich niedriger. Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß die Zellen der Mutante offenbar empfindlicher auf die Immobilisierungsprozedur reagierten und deshalb höhere Aktivitätsverluste auftraten (Ergebnisse nicht dargestellt). Mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen (DEO et al., 1983) wurden weitaus bessere Resultate erzielt. Immobilisierte Sporen keimten nur in der äußeren Gelschicht in der für sie optimalen Umgebung aus (CHIBATA et al., 1983; EIKMEIER et al., 1984) und bildeten eine dichte Myzelschicht (Abb. 16). Dennoch wurden im Gel höhere Zelldichten als in Submerskultur bestimmt, d.h. die Zellen wachsen in der schützenden Gelmatrix nachweislich besser (FUJIMURA et al., 1984). Nach Optimierung der Sporenimmobilisierung konnten die gleichen absoluten Ausbeuten wie mit freien Zellen erzielt werden, die spezifische Produktionsrate lag bei 75%. Die Patulinbildung bei Penicillium urticae war mit 'in situ' gewachsenen Zellen ebenfalls höher als mit herkömmlich immobilisierten Zellen (DEO & GAUCHER, 1983). Allgemein ist eine relative Produktivität von 50% für Verfahren mit immobilisierten Zellen als gut zu bezeichnen (KLEIN & WAGNER, 1983). KELLNER (1984) konnte beim Wildtyp Tü 901 zwischen beiden Immobilisierungsverfahren jedoch keinen signifikanten Unterschied feststellen.

Die Immobilisierung von Sporen ließ sich mit den in Schüttelkulturen bestimmten Parametern im scale up auf einen Blattrührfermenter übertragen, wobei die Ausbeute sogar noch um 25% höher lag. Allerdings war die mechanische Belastung durch Scherkräfte zu hoch, so daß am Ende der Fermentation das Medium durch Gelabrieb (KUEK & ARMITAGE, 1985) und freies Myzel stark getrübt war. Dieses Problem ließe sich auf verschiedene Weisen umgehen. Durch die Wahl besser geeigneter Reaktoren (VENKATASUBRAMANIAN et al., 1983), wie z.B. einen Airlift-Fermenter (KLOOSTERMAN & LILLY, 1985), könnte die mechanische Belastung reduziert werden. Die andere Möglichkeit bestünde darin, das Gel durch Trocknung (VORLOP & KLEIN, 1983) oder

Behandlung mit vernetzenden Agenzien (Glutaraldehyd, Hexamethylendiamin) (TAKAMATSU et al., 1981) zu festigen. Außerdem würden für die Immobilisierung von Sporen, die wesentlich widerstandsfähiger sind, auch Trägermaterialien in Frage kommen, die meist für lebende Zellen ungeeignet sind (z.B. Kunststoffpolymere, lichtvernetzende Harze).
Die Herstellung größerer Mengen immobilisierter Zellen bedarf technischer Hilfsmittel. Mit der in Abb. 2 dargestellten Immobilisierungsdüse ist es möglich, Gelkugeln mit definierter Größe im Labormaßstab herzustellen. Mit einer aus 42 Kanülen bestehenden Düse ist es möglich, etwa 3-5 kg Gel pro Stunde anzufertigen (VORLOP & KLEIN, 1983). Noch leistungsfähiger ist die Resonanzdüse, bei der der Alginatstrom in der Kanüle in Schwingungen versetzt und damit unterbrochen wird. Dabei lösen sich an der Kanülenöffnung gleichmäßig Tropfen ab (HULST et al., 1985). Mit dieser Düse können beispielsweise innerhalb einer Stunde 24 l Alginatgel hergestellt werden (TRAMPER, 1985).

Bei semikontinuierlicher Nikkomycinfermentation mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen konnte die Anfangsaktivität über vier Medienwechsel erreicht werden, danach ging die Produktion zurück, und nach dem 7. Wechsel betrug die Restaktivität noch 64%. Mit in Carrageenan immobilisierten Zellen von Penicillium chrysogenum konnten unter ähnlichen Bedingungen nach ebenfalls sieben Transfers noch 69% der anfänglichen Penicillin-Ausbeute erzielt werden, wobei die Restaktivität von der Zykluslänge und der Medienzusammensetzung beeinflußt wurde (DEO & GAUCHER, 1984).

Freie Zellen des Nikkomycinproduzenten, die in gleicher Weise semikontinuierlich inkubiert wurden, verloren bereits nach dem ersten Medienwechsel 35% ihrer Anfangsaktivität, und nach vier Überführungen wurden nur noch 25% der ursprünglichen Nikkomycinmenge produziert (Ergebnisse nicht dargestellt). Bereits nach dem zweiten Transfer bildeten freie Zellen von

Penicillium chrysogenum ebenfalls kein Penicillin mehr (DEO & GAUCHER, 1984). Die Ursachen für diese Aktivitätsverluste sind noch wenig untersucht. In Frage kommen eine zunehmende Limitierung bestimmter Zwischenverbindungen, eine Endproduktheimmung von Stoffwechselenzymen oder der Verlust von Enzymen, der aufgrund eigener Instabilität bzw. beim Abbau durch intrazelluläre Proteasen eintritt.
DEO & GAUCHER (1985) konnten zeigen, daß die Patulinbildung bei semikontinuierlicher Kultivierung regeneriert werden konnte, wenn die immobilisierten Zellen für kurze Zeit in Vollmedium inkubiert wurden. Weitere Untersuchungen ergaben, daß für eine konstante Patulinbildung die Neusynthese von Enzymen notwendig ist, die durch Zufütterung von 10%-igem Vollmedium ohne nennenswerte Zunahme der Biomasse erreicht wurde.

Die Eigenschaft von Mikroorganismen, sich auf geeigneten Partikeln oder Flächen festzuwachsen, wird bei der passiven Oberflächenimmobilisierung ausgenutzt. Streptomyceten bewachsen beispielsweise Celitpartikel und zeigen eine mit freien Zellen vergleichbare Antibiotikaproduktion (ARCURI et al., 1983; WANG et al., 1984), die unter geeigneten Bedingungen kontinuierlich betrieben werden kann (BAKER et al., 1982).

Die auf Celit gewachsenen Zellen von Streptomyces tendae produzieren Nikkomycin, verhalten sich bei semikontinuierlicher Kultivierung in definiertem Medium wie freie Zellen, d.h. sie verlieren schnell ihre Fähigkeit zur Nikkomycinbildung. Durch kurzzeitige Inkubation im Wachstumsmedium läßt sie sich teilweise wiederherstellen (CONZELMANN, persönliche Mitteilung, 1985).

3. Biogenese und Wirkung

Die Nikkomycine haben sich als sehr potente Hemmstoffe der Chitin-Synthase erwiesen (COHEN & CASIDA, 1980; FURTER &

RAST, 1985). Ihre Wirkung auf Organismen ist abhängig vom Transport in die Zelle, von der Inaktivierung durch zelluläre Enzyme und von der Affinität zum Wirkort. Nikkomycin Z/X wird bei Candida albicans offensichtlich über das Dipeptid- Transportsystem aufgenommen. Die Hemmung läßt sich durch Dipeptide aufheben; Mutanten mit defektem Transportsystem sind resistent (YADAN et al., 1984; McCARTHY et al., 1985; PAYNE & SHALLOW, 1985). Polyoxin L-Analoge mit natürlichen L-Aminosäuren als Seitenkette hemmen in vitro die Chitin-Synthase aus Candida albicans, intakte Zellen werden dagegen kaum beeinflußt (EMMER et al., 1985). In Zellextrakten konnte eine rasche Spaltung der Peptidbindung nachgewiesen werden, das natürliche Polyoxin D war gegenüber diesen Peptidasen resistent (SHENBAGAMURTHI et al., 1983). Die Bindung an das Enzym, deren Effektivität sich in den K_I-Werten widerspiegelt, wird von bestimmten funktionellen Gruppen vermittelt. Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei den verwandten Polyoxinen haben ergeben, daß vor allem die freie NH_2-Gruppe an C-2'' und der Carbonylsauerstoff an C-1'' der Seitenkette sowie die freie Carboxylgruppe der Aminohexuronsäure für die Bindung an das Enzym wichtig sind (HORI et al., 1974; AZUMA et al., 1977).

Die biologische Aktivität der Nikkomycine nimmt in der Reihenfolge von Nikkomycin X, Z, O bis K mit Ausnahme weniger Organismen ab (BORMANN et al., 1985). Die ID_{50} für Nikkomycin K_z, gemessen an der Chitin-Synthase von Phycomyces spec., liegt mit $2{,}5 \times 10^{-4}$ mol/l um mehr als Faktor 150 über dem Wert von Nikkomycin X ($1{,}6 \times 10^{-6}$ mol/l) (RATHMANN, 1984). Ein an der Phenolgruppe methoxy-substituiertes Nikkomycin B zeigt mit Ausnahme von Candida albicans ebenfalls eine verringerte Aktivität verglichen mit dem natürlichen Nikkomycin B (ZIMMERMANN, 1984). Die absolute Konfiguration der Aminosäure-Seitenkette der Nikkomycine E, P_x, R_z, K und O ist 2S,3S,4R und damit an C-4 unterschiedlich zu den Nikkomycinen B, X, Z, I und J (KÖNIG et al., in Vorbereitung). Inwieweit sich

dieser Unterschied auf die biologische Aktivität auswirkt, bleibt zu klären.

Die in der vorliegenden Arbeit isolierten neuen Nikkomycine $W_{x/z}$ sind trotz intakter Nucleosid-Peptid-Struktur im biologischen Test nicht aktiv. Im Enzymtest dagegen hemmt Nikkomycin $W_{x/z}$ in einer Konzentration von 100 µM die Chitin-Synthase aus Coprinus cinereus zu 97% (RÖHL, persönliche Mitteilung, 1985). Die fehlende Wirkung von Nikkomycin $W_{x/z}$ auf ganze Zellen ist vermutlich auf die rasche intrazelluläre Spaltung durch Peptidasen zurückzuführen, die die natürliche Aminosäure L-Tyrosin wesentlich effizienter abspalten als die ungewöhnlichen Aminosäuren in der Seitenkette der übrigen Nikkomycine.

Nikkomycin W ist ebenso wie Nikkomycin B (RATHMANN, 1984) wesentlich pH-stabiler. Die pH-Labilität der pyridylhaltigen Nikkomycine wird auf den Nachbargruppeneffekt des Pyridylstickstoffs und der γ-Hydroxylgruppe zurückgeführt (URAMOTO et al., 1980).

Die Biogenese der Nikkomycine ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei der Herkunft der 5-Aminohexuronsäure wird, wie bei den Polyoxinen nachgewiesen, von Uridin bzw. einer aktivierten Ribose (z.B. Phosphoribosylpyrophosphat) ausgegangen. Als Base wird Uracil direkt eingebaut. 4-Formyl-4-Imidazolin-2-on leitet sich von Histidin ab, das über Urocaninsäure in die Imidazolinbase umgewandelt wird, wie durch Einbauversuche mit Histidin und Adenin gezeigt werden konnte (SCHMIDT, persönliche Mitteilung, 1985). Der aromatische Teil der Seitenkette stammt vom Lysin (SOMMER, 1983), das beim Wildstamm durch eine α-Transaminase in 1-Piperidein-2-carbonsäure zyklisiert (JORDAN et al., 1984) und über Picolinsäure (KELLNER, persönliche Mitteilung, 1985) ins Nikkomycin eingebaut wird. Wie der Ringschluß bei den Aminosäuren mit der R-Konfiguration an C-4 erfolgt, ist nicht bekannt.

Die Phenylgruppe stammt vermutlich aus dem Stoffwechsel der aromatischen Aminosäuren. Der möglicherweise darin deregulierte, Fluortyrosin-resistente Stamm Tü 901/395/11/32 bildet die neuen Nikkomycine W mit L-Tyrosin in der Seitenkette.

Über die Herkunft der 3-substituierten Pyridylgruppe der Nikkomycine P und R_z liegen noch keine Untersuchungen vor. Die Struktur deutet auf Derivate der Nicotinsäure hin.

Mit der Isolierung der im aliphatischen Teil der Aminosäure-Seitenkette modifizierten Nikkomycine K, O und W haben sich neue Aspekte bezüglich der Biogenese ergeben. 2-Amino-4-hydroxy-buttersäure könnte als Vorstufe durch Methylierung zu Homothreonin umgewandelt werden. Diese Methylgruppe, die nicht aus dem Methionin stammt, könnte aus Serin hervorgehen (SOMMER, 1983). Bei den Polyoxinen ist Serin ebenfalls an der Methylierung von Uracil beteiligt (ISONO & SUZUKI, 1979). Demnach würden sich die Stämme lediglich in der Aktivität dieser 'Methyltransferase' unterscheiden. Denkbar wäre auch, daß das Enzym, das diese modifizierte Buttersäure an die aromatische Carbonsäure bindet, so unspezifisch ist und auch C-3-Vorstufen einbaut. Somit wäre nur die Bereitstellung der entsprechenden C-3- bzw. C-4-Vorstufen in den einzelnen Stämmen unterschiedlich. Eine mit geringerer Effizienz eingebaute 2-Amino-4-hydroxy-buttersäure könnte bei den Mutanten den relativen Mangel der Aminosäure-Seitenkette und den daraus resultierenden hohen Anteil an Nikkomycin C im Medium erklären.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Mit der Mutante Tü 901/395/11 von Streptomyces tendae ETTLINGER wurden Studien zur Optimierung und Regulation der Nikkomycin K- und O-Produktion durchgeführt.

Mit optimierter Nährlösung wurden in batch-Fermentationen 450 mg/l Nikkomycin K und O gebildet. Erhöhte Hefeextraktanteile im Medium wirkten sich bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp stärker negativ auf die Produktion aus.

Die Nikkomycinbildung in 'resting-cell' Kulturen hing vom Alter der Vorkultur, der Zelldichte und dem Anfangs-pH-Wert ab. In einem einfachen definierten Medium mit Glucose, Ammoniumsulfat und Spurenelementen konnte die maximale spezifische Produktbildungsrate von 0,5 mg/g TG/h erzielt werden.

Die Nikkomycinsynthese wurde durch anorganisches Phosphat in Konzentrationen über 20 mM vermindert. Unter Eisenmangel wurde das Verhältnis von Nikkomycin K zu O zugunsten des nichthydroxylierten Nikkomycin K verschoben.

Die Stimulierung der Nikkomycinbildung durch L-Isoleucin unter 'resting-cell' Bedingungen war abhängig vom Alter der Vorkultur, der Medienzusammensetzung und der Belüftung. In Gegenwart von Isoleucin war in der Fettsäurenzusammensetzung der Cytoplasmamembran das Verhältnis von 12-Methyltetradekansäure zu Isopalmitinsäure verändert, wobei der Isopalmitinsäureanteil stark reduziert war.

Die Nikkomycinproduktion von freien und immobilisierten Zellen wurde in definierten Produktionsmedien vergleichend untersucht. Mit in Calciumalginat immobilisierten Sporen, die unter Wachstumsbedingungen in der äußeren Gelschicht auskeim-

ten, wurden wesentlich bessere Nikkomycinausbeuten als mit homogen immobilisierten Zellen erzielt.

Die Produktion mit 'in situ' gewachsenen immobilisierten Zellen war abhängig von der Inkubationsdauer im Wachstumsmedium, dem eingesetzten Sporentiter, der Alginatkonzentration, der Perlengröße, den Wachstumsbedingungen und der Belüftung. Bei semikontinuierlicher Prozeßführung waren nach 7 Passagen noch 64% der Anfangsaktivität erhalten.

Aus Kulturen der Fluortyrosin-resistenten Mutante Tü 901/395/11/32 wurden die neuen Nikkomycine W_x und W_z isoliert, bei denen am Nucleosid C_x bzw. C die Aminosäure L-Tyrosin peptidisch gebunden ist. Diese Verbindungen waren trotz intakter Nucleosid-Peptid-Struktur gegen alle getesteten Pilze biologisch nicht aktiv.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

AHARONOWITZ, Y.: Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. Ann. Rev. Microbiol. **34**, 209-233 (1980)

ARCURI, E.J., J.R. NICHOLS, T.S. BRIX, V.G. SANTAMARINA, B.C. BUCKLAND and S.W. DREW: Thienamycin production by immobilized cells of Streptomyces cattleya in a bubble column. Biotechnol. Bioeng. **25**, 2399-2411 (1983)

ARIMA, K., H. OKAZAKI, H. ONO, K. YAMADA and T. BEPPU: Effect of exogenous fatty acids on the cellular fatty acid composition and Neomycin formation in a mutant strain of Streptomyces fradiae. Agr. Biol. Chem. **37**, 2313-2317 (1973)

AVRON, B., R.M. DEUTSCH and D. MIRELMAN: Chitin synthesis inhibitors prevent cyst formation by Entamoeba trophozoites. Biochem. Biophys. Res. Comm. **108**, 815-821 (1982)

AZUMA, T., T. SAITA and K. ISONO: Polyoxinanalogs III. Synthesis and biological activity of aminoacyl derivatives of Polyoxin C and L. Chem. Pharm. Bull. **25**, 1740-1748 (1977)

BAKER, E.E., R.J. PREVOZNAK, S.W. DREW and B.C. BUCKLAND: Thienamycin production by Streptomyces cattleya cells immobilized in celite beads. Dev. Ind. Microbiol. **24**, 467-474 (1982)

BEHMER, C.J. and A.L. DEMAIN: Further studies on carbon catabolite regulation of ß-lactam antibiotic synthesis in Cephalosporium acremonium. Curr. Microbiol. **8**, 107-114 (1983)

BORMANN, C.: Persönliche Mitteilung (1985)

BORMANN, C., W. HUHN, H. ZÄHNER, R. RATHMANN, H. HAHN and W.A. KÖNIG: Metabolic products of microorganisms. 228. New Nikkomycins produced by mutants of Streptomyces tendae. J. Antibiot. **38**, 9-16 (1985)

BRANA, A.F., W.-S. HU and A.L. DEMAIN: Involvement of aeration in carbon source regulation of cephem antibiotic biosynthesis in Streptomyces clavuligerus. Biotechnol. Lett. **5**, 791-794 (1983)

BRIDSON, E.Y. and A. BRECKER: Design and formulation of microbial culture media. In: Methods in Microbiology, Vol. 3A, NORRIS, J.R. and D.W. RIBBONS (Eds.), pp. 229-295, Academic Press, New York, London (1970)

BRILLINGER, G.U.: Metabolic products of microorganisms. Chitin synthase from fungi, a test model for substances with insecticidal properties. Arch. Microbiol. **121**, 71-74 (1979)

CASTRO, J.M., P. LIRAS, J. CORTES and J.F. MARTIN: Regulation of α-aminoadipyl-cysteinyl-valine, isopenicillin N synthetase, isopenicillin N isomerase and deacetoxycephalosporin C synthetase by nitrogen sources in Streptomyces lactamdurans. Appl. Microbiol. Biotechnol. **22**, 32-40 (1985)

CHEETHAM, P.S.J.: Physical studies on the mechanical stability of columns of calcium alginate gel pellets containing entrapped microbial cells. Enzyme Microb. Technol. **1**, 183-188 (1979)

CHEETHAM, P.S.J., K.W. BLUNT and C. BUCKE: Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. Bio-

technol. Bioeng. **21**, 2155-2168 (1979)

CHIBATA, J. and T. TOSA: Immobilized cells: Historical background. In: Applied Biochemistry and Bioengineering, Vol. 4, CHIBATA, J. and L.B. WINGARD (Eds.), pp. 1-9, Academic Press, New York, London (1983)

CHIBATA, J., T. TOSA and M. FUJIMURA: Immobilized microbial cells. Ann. Rep. Ferment. Proc. **6**, 1-22 (1983)

COHEN, E. and J.E. CASIDA: Inhibition of Tribolium gut chitin synthetase. Pestic. Biochem. Physiol. **13**, 129-136 (1980)

COHEN, E. and J.E. CASIDA: Properties and inhibition of insect integumental chitin synthetase. Pestic. Biochem. Physiol. 17, 301-306 (1982)

CONZELMANN, C.: Persönliche Mitteilung (1985)

DÄHN, U., H. HAGENMAIER, H. HÖHNE, W.A. KÖNIG, G. WOLF und H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen: 154. Mitteilung. Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitinsynthese bei Pilzen. Arch. Mikrobiol. **107**, 143-160 (1976)

DEHLER, W.: Nikkomycine - Studien zur Fermentation und Isolierung. Dissertation, Universität Tübingen (1979)

DELZER, J.: Mutasynthese und Gerichtete Fermentation in der Nikkomycinreihe. Dissertation, Universität Tübingen (1983)

DELZER, J., H.-P. FIEDLER, H. MÜLLER, H. ZÄHNER, R. RATHMANN, K. ERNST and W.A. KÖNIG: New nikkomycins by mutagenesis and directed fermentation. J. Antibiot. **37**, 80-82 (1984)

DEMAIN, A.L.: Catabolite regulation in industrial microbiology. In: Overproduction of microbial products. KRUMPHANZL, V., B. SIKYTA and Z. VANEK (Eds.), pp. 3-20, Academic Press, London, New York (1982)

DEMAIN, A.L. and Y.M. KENNEL: Resting-cell studies on carbon-source regulation of ß-lactam antibiotic biosynthesis. J. Ferment. Technol. **56**, 323-328 (1978)

DEO, Y.M. and G.M. GAUCHER: Semi-continuous production of the antibiotic patulin by immobilized cells of Penicillium urticae. Biotechnol. Lett. **5**, 125-130 (1983)

DEO, Y.M.and G.M. GAUCHER: Semicontinuous and continuous production of Penicillin-G by Penicillium chrysogenum cells immobilized in κ-carrageenan beads. Biotechnol. Bioeng. **26**, 285-295 (1984)

DEO, Y.M. and G.M. GAUCHER: Effect of nitrogen supplementation on the longevity of antibiotic production by immobilized cells of Penicillium urticae. Appl. Microbiol. Biotechnol. **21**, 220-227 (1985)

DEO, Y.M., J.W. COSTERTON and G.M. GAUCHER: Examination of immobilized fungal cells by phase-contrast and scanning electron microscopy. Can. J. Microbiol. **29**, 1642-1649 (1983)

DREHER, R.: Untersuchungen zur Funktion von ω-alicyclischen Fettsäuren in Bacillus-Membranen. Dissertation, Universität Tübingen (1978)

EGOROV, N.S., I.P. BARANOVA and Y.U.I. KOZLOVA: Nisin production by immobilized cells of the lactic acid bacterium Streptococcus lactis. Antibiotiki, **23**, 872-874 (1978)

EIKMEIER, H., F. WESTMEIER and H.J. REHM: Morphological development of Aspergillus niger immobilized in Ca-alginate and κ-carrageenan. Appl. Microbiol. Biotechnol. **19**, 53-57 (1984)

EMMER, G., N. S. RYDER and M. A. GRASSBERGER: Synthesis of new Polyoxin derivatives and their activity against chitin synthase from Candida albicans. J. Med. Chem. **28**, 278-281 (1985)

ENDO, A., K. KAKIKI and T. MISATO: Mechanism of action of the antifungal agent Polyoxin D. J. Bacteriol. **104**, 189-196 (1970)

FAWCETT, J.K. and J.E. SCOTT: A rapid method for the determination of urea. J. Clin. Path. **13**, 156-159 (1960)

FERLAN, J.: Neue Produkte durch immobilisierte Zellen und Enzyme. Umschau **21**, 632-634 (1984)

FIEDLER, H.-P.: Quantitation of Nikkomycins in biological fluids by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography. J. Chromat. **204**, 313-318 (1981)

FIEDLER, H.-P.: Screening for new microbial products by high-performance liquid chromatography using a photodiode array detector. J. Chromat. **316**, 487-494 (1984)

FIEDLER, H.-P., R. KURTH, J. LANGHÄRIG, J. DELZER and H. ZÄHNER: Nikkomycins: Microbial inhibitors of chitin synthase. J. Chem. Tech. Biotechnol. **32**, 271-280 (1982)

FREEMAN, A. and Y. AHARONOWITZ: Immobilization of microbial cells in crosslinked, prepolymerized, linear polyacrylamide gels: Antibiotic production by immobilized Streptomyces clavuligerus cells. Biotechnol. Bioeng. **23**,

2747-2759 (1981)

FUJIMURA, M., J. KATO, T. TOSA and I. CHIBATA: Continuous production of L-arginine using immobilized growing Serratia marcescens cells: Effectiveness of supply of oxygen gas. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19, 79-84 (1984)

FUKUI, S. and A. TANAKA: Immobilized microbial cells. Ann. Rev. Microbiol. 36, 145-172 (1982)

FURTER, R. and D.M. RAST: A comparison of the chitin synthase-inhibitory and antifungal efficacy of nucleoside-peptide antibiotics: Structure-activity relationships. FEMS Microbiol. Lett. 28, 205-211 (1985)

GOODAY, G.W., J. WOODMANN, E.A. CASSON, and C.A. BROWNE: Effect of nikkomycin on chitin spine formation in the diatom Thalassiosira fluviatilis, and observations on its peptide uptake. FEMS Microbiol. Lett. 28, 335-340 (1985)

GOW, L.A. and C.P. SELITRENNIKOFF: Chitin synthetase of Neurospora crassa: Inhibition by Nikkomycin, Polyoxin B and UDP. Curr. Microbiol. 11, 211-216 (1984)

GRÄFE, U.: Relevance of microbial nitrogen metabolism to production of secondary metabolites. In: Overproduction of microbial products. KRUMPHANZL, V., B. SIKYTA and Z. VANEK (Eds.), pp. 63-75, Academic Press, London, New York (1982)

GRÄFE, U., M. ROTH and D. KREBS: Effect of L-valine and L-isoleucine on fatty acid composition of Streptomyces hygroscopicus and S. griseus. Z. Allg. Mikrobiol. 22, 595-599 (1982a)

GRÄFE, U., G. REINHARDT, D. KREBS, M. ROTH and E.J. BORMANN: Biochemical characteristics of non-streptomycin-producing mutants of Streptomyces griseus. II. Lipids and fatty acid composition of vegetative mycelia. Z. Allg. Mikrobiol. **22**, 97-106 (1982b)

HAGENMAIER, H., A. KECKEISEN, H. ZÄHNER and W.A. KÖNIG: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 102. Mitteilung: Aufklärung der Struktur des Nukleosidantibiotikums Nikkomycin X. Liebigs Ann. Chem., 1494-1502 (1979)

HEIM, J., Y.-Q. SHEN, S. WOLFE and A.L. DEMAIN: Regulation of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase by carbon source during the fermentation of Cephalosporium acremonium. Appl. Microbiol. Biotechnol. **19**, 232-236 (1984)

HIEMSTRA, H., L. DIJKHUIZEN and W. HARDER: Diffusion of oxygen in alginate gels related to the kinetics of methanol oxidation by immobilized Hansenula polymorpha cells. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **18**, 189-196 (1983)

HÖHNE, H.: Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der mikrobiellen Chitinsynthese. Dissertation, Universität Tübingen (1974)

HOPWOOD, D.A., H.M. WRIGHT, J.M. BIBB and S.N. COHEN: Genetic recombination through protoplast fusion in Streptomyces. Nature **268**, 171-174 (1977)

HORI, M., K. KAKIKI and T. MISATO: Further study on the relation of Polyoxin structure to chitin synthetase inhibition. Agr. Biol. Chem. **38**, 691-698 (1974)

HU, W.-S., A.F. BRANA and A.L. DEMAIN: Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cells of

Streptomyces clavuligerus and its reversal by protein synthesis inhibitors. Enzyme Microb. Technol. **6**, 155-160 (1984)

HÜTTER, R.: Systematik der Streptomyceten. Karger Verlag, Basel (1967)

HULST, A., J. TRAMPER, K. VAN'T RIET and J.M.M. WESTERBEEK: A new technique for the production of immobilized biocatalysts in large quantities. Biotechnol. Bioeng. **27**, 870-876 (1985)

INOUE, S., Y. NISHIZAWA and S. NAGAI: Effects of phosphate and asparagine on Streptomycin formation by Streptomyces griseus in pH-stat cultures. J. Ferment. Technol. **60**, 105-110 (1982)

ISONO, K. and S. SUZUKI: The Polyoxins: Pyrimidine nucleoside peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis. Heterocycles **13**, 333-351 (1979)

ISONO, K., I. NAGATSU, Y. KAWASHIMA and S. SUZUKI: Studies on Polyoxins, antifungal antibiotics. Part I. Isolation and characterization of Polyoxin A and B. Agric. Biol. Chem. **29**, 848-854 (1965)

JORDAN, B., R.M. SCHMIDT and H. PAPE: Nikkomycin formation and lysine metabolism in Streptomyces tendae. In: Third European Congress on Biotechnology, Vol. 1, pp. 451-455, Verlag, Weinheim (1984)

KARUBE, I., S. SUZUKI and E.J. VANDAMME: Antibiotic production with immobilized living cells. In: Biotechnology of industrial antibiotics, Vol. 22, VANDAMME, E.J. (Ed.), pp. 761-780, Dekker Inc., New York, Basel (1984)

KELLNER, O.: Untersuchungen zur Nikkomycinbildung mit immobilisierten Zellen. Diplomarbeit, Universität Münster (1984)

KELLNER, O.: Persönliche Mitteilung (1985)

KENNEDY, B.F. and J.M.S. CABRAL: Immobilized living cells and their applications. In: Applied Biochemistry and Bioengineering, Vol. 4, CHIBATA, I. and L.B. WINGARD (Eds.), pp. 189-280, Academic Press, New York, London (1983)

KIRST, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis. Dissertation, Universität Tübingen (1971)

KLEIN, J. and F. WAGNER: Methods for the immobilization of microbial cells. In: Applied Biochemistry and Bioengineering, Vol. 4, CHIBATA, I. and D.B. WINGARD (Eds.), pp. 11-51, Academic Press, New York, London (1983)

KLOOSTERMAN, J. and M.D. LILLY: An airlift loop reactor for the transformation of steroids by immobilized cells. Biotechnol. Lett. **7**, 25-30 (1985)

KOBINATA, K., M. URAMOTO, M. NISHII, H. KUSAKABE, G. NAKAMURA and K. ISONO: Neopolyoxins A, B and C, new chitin synthetase inhibitors. Agric. Biol. Chem. **44**, 1709-1711 (1980)

KÖNIG, W.A., W. HASS, W. DEHLER, H.-P. FIEDLER and H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen: 189. Mitteilung. Strukturaufklärung und Partialsynthese des Nucleosidantibiotikums Nikkomycin B. Liebigs Ann. Chem., 622-628 (1980)

KÖNIG, W.A., W. HAHN, R. RATHMANN, W. HASS, A. KECKEISEN, H.

HAGENMAIER, C. BORMANN, W. DEHLER, R. KURTH und H. ZÄHNER: Drei neue Aminosäuren aus dem Nikkomycin-Komplex: Strukturaufklärung und Synthese. Liebigs Ann. Chem., in Vorbereitung.

KUEK, C. and T.M. ARMITAGE: Scanning electron microscopic examination of calcium alginate beads immobilizing growing mycelia of Aspergillus phoenicus. Enzyme Microb.Technol. 7, 121-125 (1985)

KURTH, R.: Untersuchungen zur Regulation der Nikkomycinbildung und Optimierung einer pO_2-feeding-Fermentation. Dissertation, Universität Tübingen (1981)

LANGHÄRIG, J.: Aufstellung eines Produktionsspektrums von Tü 901 - Streptomyces tendae ETTLINGER. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1978)

LANGHÄRIG, J.: Untersuchungen von Mutanten des Nikkomycin-Produzenten Tü 901. Dissertation, Universität Tübingen (1981)

LEHNINGER, A.L.: Biochemistry, 2 nd. Worth. Publishers, Inc., New York (1975)

LINKO, P. and Y. LINKO: Applications of immobilized microbial cells. In: Applied Biochemistry and Bioengineering, Vol.4, CHIBATA, I. and L.B. WINGARD (Eds.), pp. 53-151, Academic Press, New York, London (1983)

LÜBBE, C., S. WOLFE and A.L. DEMAIN: Repression and inhibition of cephalosporin synthetases in Streptomyces clavuligerus by inorganic phosphate. Arch. Microbiol. **140**, 317-320 (1985)

MARTIN, J.F.: Control of antibiotic synthesis by phosphate.

Adv. Biochem. Eng. **6**, 105-127 (1977)

MARTIN, J.F. and A.L. DEMAIN: Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Rev. **44**, 230-251 (1980)

MAZUMDER, T.K., K. SONOMOTO, A. TANAKA and S. FUKUI: Sequential conversion of cortexolone to prednisolone by immobilized mycelia of Curvularia lunata and immobilized cells of Arthrobacter simplex. Appl. Microbiol. Biotechnol. **21**, 154-161 (1985)

McCARTHY, P.J., P.F. TROKE and K. GULL: Mechanism of action of Nikkomycin and the peptide transport system of Candida albicans. J. Gen. Microbiol. **131**, 775-780 (1985)

MORIKAWA, Y.,I. KARUBE and S. SUZUKI: Penicillin G production by immobilized whole cells of Penicillium chrysogenum. Biotechnol. Bioeng. **21**, 261-270 (1979a)

MORIKAWA, Y., K. OCHIAI, I. KARUBE and S. SUZUKI: Bacitracin production by whole cells immobilized in polyacrylamide gel. Antimicrob. Agents Chemother. **15**, 126-130 (1979b)

MÜLLER, H.,R. FURTER, H. ZÄHNER and D.M. RAST: Metabolic products of microorganisms: 203. Inhibition of chitosomal chitin synthase and growth of Mucor rouxii by Nikkomycin Z, Nikkomycin X, and Polyoxin A: A comparison. Arch. Microbiol. **130**, 195-197 (1981)

NAGATO, N., Y. OKUMURA, R. OKAMOTO and T. ISHICURA: Carbon catabolite regulation of Neoviridogrisein production by glucose. Agric. Biol. Chem. **48**, 3041-3045 (1984)

NILSSON, K., S. BIRNBAUM, S. FLYGARE, L. LINSE, U. SCHRÖDER, U. JEPPSSON, P.-O. LARSSON, K. MOSBACH and P. BRODELIUS: A general method for the immobilization of cells with

preserved viability. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17, 319-326 (1983)

OKAZAKI, H., T. BEPPU and K. ARIMA: Induction of antibiotic formation in Streptomyces sp. No. 362 by the change of cellular fatty acid spectrum. Agric. Biol. Chem. **38**, 1455-1461 (1974)

OMURA, S. and Y. TANAKA: Control of ammonium ion level in antibiotic fermentation. In: Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes. ORTIZ-ORTIZ, L., L.F. BOJALIL and V. YAKOLE (Eds.), pp. 367-380, Academic Press, Inc., Orlando (1984)

PAPE, H.: Persönliche Mitteilung (1985)

PAYNE, J.W. and D.A. SHALLOW: Studies on drug targeting in the pathogenic fungus Candida albicans: Peptide transport mutants resistant to polyoxins, nikkomycins and bacilysin. FEMS Microbiol. Lett. **28**, 55-60 (1985)

RADOVICH, J.M.: Mass transfer effects in fermentations using immobilized whole cells. Enzyme Microb. Technol. **7**, 2-10, (1185)

RAMALEY, R.F.: Molecular biology of extracellular enzymes. Adv. Appl. Microbiol. **25**, 37-55 (1979)

RATHMANN, R.: Untersuchungen zur Konfiguration und Konformation der Nucleosidbausteine der Nikkomycine und Darstellung halbsynthetischer Nikkomycine. Dissertation, Universität Hamburg (1984)

REVILLA, G., M.J. LOPEZ-NIETO, J.M. LUENGO and J.F. MARTIN: Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by Penicillium chrysogenum. J. Antibiot. **37**, 781-789 (1984)

RÖHL, F.: Persönliche Mitteilung (1985)

ROMERO, J., P. LIRAS and J.F. MARTIN: Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in Streptomyces clavuligerus. Appl. Microbiol. Biotechnol. **20**, 318-325 (1984)

SCHMIDT, R.M.: Persönliche Mitteilung (1985)

SHEN, Y.-Q., J. HEIM, N.A. SOLOMON, S. WOLFE and A.L. DEMAIN: Repression of ß-lactam production in Cephalosporium acremonium by nitrogen sources. J. Antibiot. **37**, 503-511 (1984)

SHENBAGAMURTHI, P., H. A. SMITH, J. M. BECKER, A. STEINFELD and F. NAIDER: Design of anticandidal agents: Synthesis and biological properties of analogues of Polyoxin L. J. Med. Chem. **26**, 1518-1522 (1983)

SOMMER, U.: Untersuchungen zur Biosynthese von Nikkomycin D. Dissertation, Universität Münster (1983)

TAKAMATSU, S., K. YAMAMOTO, T. TOSA and I. CHIBATA: Stabilization of L-aspartate ß-decarboxylase activity of Pseudomonas dacunhae immobilized with carrageenan. J. Ferment. Technol. **59**, 489-493 (1981)

TRAMPER, J.: Immobilizing biocatalysts for the use in syntheses. Trends Biotechnol. **3**, 45-50 (1985)

ULLRICH, V.: Enzymatische Hydroxylierung mit molekularem Sauerstoff. Angew. Chem. **84**, 689-724 (1972)

URAMOTO, M., K. KOBINATA, K. ISONO, T. HIGASHIJIMA, T. MIYAZAWA, E.E. JENKINS and J.A. McCLOSKEY: Structures of Neopolyoxins A, B, and C. Tetrahedron Lett. **21**, 3395-3398 (1980)

URAMOTO, M., M. MATSUOKA, J.G. LIEHR, J.A. McCLOSKEY and I. ISONO: Polyoxin N, a new member of the polyoxin family. Agric. Biol. Chem. **45**, 1901-1902 (1981)

VEELKEN, M.: Tylosin- und Nikkomycin-Synthese mit immobilisierten Streptomyceten. Dissertation, Universität Münster (1983)

VEELKEN, M. and H. PAPE: Production of tylosin and nikkomycin by immobilized Streptomyces cells. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **15**, 206-210, (1982)

VEELKEN, M. and H. PAPE: Production of nikkomycin by immobilized Streptomyces cells - Physiological properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. **19**, 146-152 (1984)

VENKATASUBRAMANIAN, K. and W.R. VIETH: Immobilized microbial cells. Proc. Ind. Microbiol. **16**, 61-86 (1979)

VENKATASUBRAMANIAN, K., S.B. KARKARE and W.R. VIETH: Chemical engineering analysis of immobilized-cell systems. In: Applied Biochemistry and Bioengineering, Vol.4, CHIBATA, I. and L.B. WINGARD (Eds.), pp. 311-349, Academic Press, New York, London (1983)

VORLOP, K.D. and J. KLEIN: New developments in the fields of cell immobilization - Formation of biocatalysts by ionotropic gelation. In: Enzyme Technology, LAFFERTY, R.M. (Ed.), pp. 219-235, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1983)

WADA, M., J. KATO and I. CHIBATA: A new immobilization of microbial cells: Immobilized growing cells using carrageenan gel and their properties. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **8**, 241-247 (1979)

WANG, D.I.C., J. MEIER and K. YOKOYAMA: Penicillin fermentation in a 200-liter tower fermentor using cells confined to microbeads. Appl. Biochem. Biotechnol. **9**, 105-116 (1984)

WEINBERG, E.D.: Mineral element control of microbial secondary metabolism. In: Microorganisms and Minerals, WEINBERG, E.D. (Ed.), pp. 289-316, Dekker, Inc., New York (1977)

WEINBERG, E.D.: Biosynthesis of microbial metabolites - Regulation by mineral elements and temperature. In: Overproduction of microbial products, KRUMPHANZL, V., B. SIKYTA and Z. VANEK (Eds.), pp.181-194, Academic Press, London, New York (1982)

YADAN, J.-C., M. GONNEAU, P. SARTHOU and F. LE GOFFIC: Sensitivity to Nikkomycin Z in Candida albicans: Role of peptide permeases. J. Bacteriol. **160**, 884-888 (1984)

ZÄHNER, H.: What are secondary metabolites? Folia Microbiol. **24**, 435-443 (1979)

ZÄHNER, H. and R. KURTH: Over-production of microbial metabolites - The supply of precursors from intermediary metabolites. In: Overproduction of microbial products, KRUMPHANZL, V., B. SIKYTA and Z. VANEK (Eds.), pp. 167-180, Academic Press, London, New York (1982)

ZANCA, D.M. and J.F. MARTIN: Carbon catabolite regulation of the conversion of Penicillin N into Cephalosporin C. J. Antibiot. **36**, 700-708 (1983)

ZIMMERMANN, G.: Partialsynthese von natürlichem und modifiziertem Nikkomycin B. Dissertation, Universität Hamburg (1984)

ZOEBELEIN, G.: AMS 0896, ein Antibiotikum mit entwicklungshemmenden Eigenschaften. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin Dahlem, Heft 191, 282 (1979)

ZOEBELEIN, G.: Freilandversuche mit AMS 0896 gegen Spinnmilben im Obstbau. Mitt. dtsch. Ges. allg. angew. Ent. 2, 164-171 (1981)

ZOEBELEIN, G.: Persönliche Mitteilung (1983)

ZOEBELEIN, G. and J. KREHAU: Sterilisation of adult flies by Nikkomycin (AMS 0896). Mitt. dtsch. Ges. allg. angew. Ent. 4, 32-38 (1983)

Lebenslauf

12.01.1956	geboren in Ittenhausen, Landkreis Biberach/Riss
1962 - 1966	Grundschule in Ittenhausen
1966 - 1975	Kreisgymnasium Riedlingen
11.06.1975	Reifeprüfung
01.07.1975 - 30.09.1976	Wehrdienst
ab WS 1976	Lehramtsstudium Sport/Biologie an der Universität Tübingen
ab WS 1977	Biologie/Diplom-Studium an der Universität Tübingen
23.10.1978	Diplomvorprüfung in Biologie
19.05.1982	Diplomhauptprüfung in Biologie
	anschließend Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner
ab 01.10.1982	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Biologie II bei Prof. Dr. H. Zähner

Meine akademischen Lehrer waren:

H. Anke, T. Anke, W. Bessler, V. Braun, D. Bunke, H. Frank, J. Guglielmi, K. Hantke, G. Jung, O. Klee, W. Kramer, W. Loeffler, D. Mecke, W. Nakel, F. Oberwinkler, K. Poralla, W. Rähle, A. Rieker, E. Sander, H. Schenk, H. Seiler, U. Seitz, W. Seyffert, J. Strähle, H. Tichy, G. Weitzel, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Zähner

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel. 0 61 51 / 21 3 53